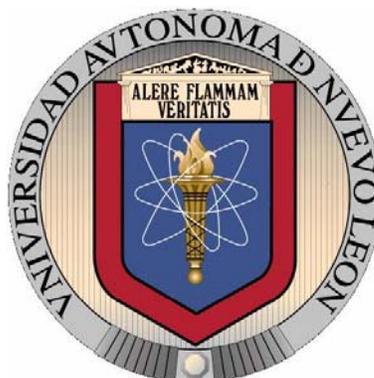


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



REBANADAS DE TUMOR MAMARIO COMO SISTEMA MULTICELULAR PARA
LA BÚSQUEDA DE COMPUESTOS CON POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO

Por

M.C. IRMA EDITH CARRANZA TORRES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
Acentuación en Química de Productos Naturales

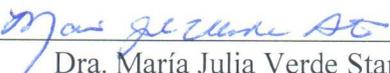
Julio, 2015

REBANADAS DE TUMOR MAMARIO COMO SISTEMA MULTICELULAR
PARA LA BÚSQUEDA DE COMPUESTOS CON
POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO

Comité de Tesis



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez
Presidente



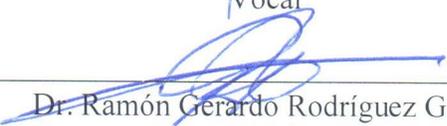
Dra. María Julia Verde Star
Secretario



Dra. Pilar Carranza Rosales
Vocal



Dra. Ruth Amelia Garza Padrón
Vocal



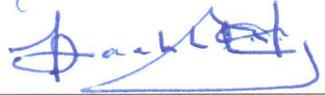
Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza
Vocal

REBANADAS DE TUMOR MAMARIO COMO SISTEMA MULTICELULAR
PARA LA BÚSQUEDA DE COMPUESTOS CON
POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Ezequiel Viveros Valdez del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. y la Dra. Pilar Carranza Rosales del Departamento de Biología Celular y Molecular del C.I.B.I.N., I.M.S.S.



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez
Director Interno



Dra. Pilar Carranza Rosales
Director Externo



Dra. Nancy Elena Guzmán Delgado
Co-director Externo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Pilar Carranza Rosales por aceptarme como parte de su equipo, por su amistad, por compartir conmigo sus conocimientos y su orientación durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco de manera especial y sincera al Dr. Ezequiel Viveros Valdez por su amistad y por proporcionarme su confianza, apoyo y dirección durante la realización de esta investigación.

De igual modo quiero agradecer la Dra. Nancy Elena Guzmán Delgado por su valiosa contribución en los análisis histopatológicos y estadísticos, así como en la discusión de resultados.

Al Comité Doctoral, por el tiempo destinado a la lectura, las correcciones y comentarios hechos a este trabajo.

Agradezco al Dr. José I. Bañuelos García por confiar en nuestro trabajo y brindarnos su apoyo durante la realización del mismo.

Quiero extender un sincero agradecimiento a la Q.B.P. Consuelo Coronado Martínez por su hermosa amistad y por toda su ayuda en la parte experimental de la tesis.

A la M.C. Guadalupe Santiago y a la Dra. Olga Esquivel por la amable disponibilidad al brindarme su apoyo en parte de este estudio.

Para mis amigos y compañeros de laboratorio Joyce, Ana, Sara, Martín, Francisco, Leobardo, Christian y Federico; muchas gracias por su amistad, complicidad y sobretodo, el ánimo que me proveyeron durante estos tres años.

A Nohemí Cano, por todo su apoyo y compañía en las largas jornadas de laboratorio.

A Seong Ju Oh (Kaya) por todos sus buenos consejos de vida que seguro seguiré aplicando en el futuro.

A mis padres y a mi hermano por siempre estar cuando los necesito y brindarme su apoyo para nunca desistir en mis metas; no me alcanzarían las palabras para expresar todo lo que han hecho por mí.

También quiero agradecer a todas las personas que de forma directa o indirecta contribuyeron en la realización de este proyecto.

A **Todos**. Gracias.

Agradecimientos institucionales:

Quiero agradecer la beca CONACYT (#338954), que me fue otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A las instituciones, departamentos y laboratorios que me recibieron y me permitieron crecer más como profesional en sus instalaciones:

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, (Departamento de Química).

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, (Departamento de Biología Celular y Molecular).

A la U.M.A.E #23 del Instituto Mexicano del Seguro Social, (Departamento de Patología, Departamento de Oncocirugía).

Gracias.

DEDICATORIA

A *Dios* por todas sus bondades y misericordias; todo se lo debo a Él.

A mi familia:

Mis padres *Irma Torres Canizales* y *David Carranza Gutiérrez* porque son mi gran ejemplo a seguir.

Y mi hermano *David Alberto* por todos los buenos momentos que hemos compartido.

“Encomienda a Jehová tus obras, Y tus pensamientos serán afirmados”

Proverbios 16:3

ÍNDICE

Sección	Página
ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer de mama y agentes antineoplásicos.....	3
2.1.1 Paclitaxel (antineoplásico de referencia).....	5
2.2 Compuestos naturales.....	5
2.2.1 Ácido cafeico (CA).....	5
2.2.2 Ácido ursólico (UR).....	6
2.2.3 Ácido rosmarínico (RS).....	8
2.3 Evaluación de la citotoxicidad.....	9
2.3.1 Modelos de estudio del cáncer.....	9
2.3.2 Cultivos celulares.....	10
2.3.3 Modelos <i>ex vivo</i> : rebanadas de tejidos.....	11
2.3.3.1 Rebanadas de tejido tumoral.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	20

	5.1 Objetivo General.....	20
	5.2 Objetivos Específicos.....	20
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
	6.1 Agentes bioactivos.....	21
	6.2 Colecta de muestras tumorales.....	21
	6.3 Población de estudio.....	21
	6.3.1 Criterios de selección de la muestra.....	22
	6.3.1.1 Criterios de inclusión.....	22
	6.3.1.2 Criterios de exclusión.....	22
	6.4 Procesamiento de las muestras.....	22
	6.5 Preparación de rebanadas y explantes de tejido tumoral.....	24
	6.6 Viabilidad tisular.....	24
	6.7 Tratamiento con paclitaxel y compuestos bioactivos.....	25
	6.8 Viabilidad metabólica. Azul Alamar.....	25
	6.9 Citotoxicidad. Liberación de LDH.....	26
	6.10 Proliferación celular. Expresión de Ki 67.....	26
	6.11 Marcadores de receptores hormonales.....	27
	6.12 Integridad morfológica. Análisis histopatológico.....	28
	6.13 Análisis estadístico.....	29
7.	RESULTADOS.....	30
	7.1 Preparación y cultivo de explantes de tejido tumoral.....	30
	7.2 Viabilidad de los explantes de tumor.....	31
	7.2.1 Viabilidad metabólica celular.....	31
	7.2.2 Integridad morfológica: Análisis histopatológico.....	32

7.2.3 Proliferación celular (Expresión de Ki 67 por inmunohistoquímica).....	32
7.3 Efecto de los compuestos bioactivos y paclitaxel sobre explantes de tumor mamario.....	34
8. DISCUSIÓN.....	40
9. CONCLUSIONES.....	46
10. PERSPECTIVAS.....	47
11. BIBLIOGRAFÍA.....	48
12. APÉNDICES.....	61
12.1 RESUMEN BIOGRÁFICO.....	62
12.2 ARTÍCULOS I.SI.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Datos clínicos e histopatológicos de los pacientes.....	30
2	Receptores hormonales y clasificación molecular.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ácido cafeico (C ₉ H ₈ O ₄).....	6
2	Ácido ursólico (C ₃₀ H ₄₈ O ₃).....	8
3	Ácido rosmarínico (C ₁₈ H ₁₆ O ₈).....	9
4	Fotografía de rebanadas de hígado preparadas utilizando el rebanador Brendel-Vitron®.....	13
5	Diagrama esquemático de la metodología general del estudio.....	23
6	Curva de viabilidad de explantes de tejido tumoral mamario.....	32
7	Integridad morfológica de los explantes de tejido tumoral cultivados <i>ex vivo</i>	33
8	Expresión nuclear del marcador de proliferación Ki 67 en explantes de cáncer de mama cultivados.....	34
9	Efecto del paclitaxel sobre la viabilidad de explantes de tumor.....	35
10	Efecto de los compuestos bioactivos y sus combinaciones con paclitaxel en cultivos de explantes de cáncer de mama.....	36
11	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la viabilidad de los explantes de tumor de tres muestras a las 48h de cultivo.....	38
12	Efecto de las combinaciones de paclitaxel-compuestos bioactivos sobre la enzima LDH liberada.....	39

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

3D	Tercera dimensión
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo (10^{-6} Gramo)
µL	Microlitro (10^{-6} Litro)
µM	Micromolar (10^{-6} Molar)
ADN	Acido desoxirribonucléico
ATP	Trifosfato de adenosina
CA	Ácido cafeico
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM/F12	Medio Eagle Modificado de Dulbecco/Mezcla de nutrientes F-12
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramo
h	Hora
IC ₅₀	Concentración inhibitoria máxima
JNK	Quinasa c-Jun N-termina
L	Litro
M	Molar
min	Minuto
mg	Miligramo (10^{-3} Gramo)
mM	Milimolar
mL	Mililitro (10^{-3} Litro)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio

NF-kB	Factor nuclear kappa B
nm	Nanómetro (10^{-9} Metro)
O ₂	Oxígeno
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasas
pH	Potencial de Hidrógeno
UR	Ácido ursólico
rpm	Revoluciones por minuto
RS	Ácido rosmarínico
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
v/v	Volumen/volumen

RESUMEN

El cáncer de mama sigue siendo una de las principales causas de muerte en mujeres en el mundo. Actualmente, la búsqueda de compuestos nuevos con actividad antitumoral, con menos efectos adversos y el desarrollo de métodos para evaluar su toxicidad es un área de intensa investigación. En este estudio se implementó la preparación y el cultivo de explantes de tumor mamario, los cuales fueron obtenidos a partir de rebanadas de tejido tumoral. Para validar el modelo se analizó el efecto del antineoplásico paclitaxel a diferentes concentraciones y posteriormente se seleccionó la concentración de 20 $\mu\text{g/mol}$ para utilizarlo como control de referencia al evaluar la actividad del ácido cafeico, ácido ursólico y ácido rosmarínico, los cuales son compuestos que han sido identificados en productos naturales como agentes quimiopreventivos, antioxidantes e inhiben el crecimiento de algunas líneas celulares de cáncer de mama. A partir de muestras de cáncer de mama se prepararon rebanadas de tejido utilizando los rebanadores de tejidos Krumdieck® y Brendel-Vitron®; de estas rebanadas, se obtuvieron explantes de 4 mm y se incubaron con los compuestos seleccionados. La viabilidad se analizó por los ensayos de Azul Alamar, liberación de LDH, y criterios histopatológicos. Los resultados mostraron que la viabilidad de los explantes cultivados en presencia de paclitaxel (control positivo) disminuyó significativamente ($P < 0.05$); sin embargo, las muestras de tumor respondieron de manera diferencial a cada compuesto. Cuando los explantes se co-incubaron con paclitaxel y los agentes bioactivos, se observó un efecto sinérgico. Este estudio muestra que el cultivo *ex vivo* de explantes de cáncer de mama ofrece una alternativa adecuada para evaluar compuestos naturales o sintéticos con propiedades antitumorales dentro del complejo microambiente tumoral.

ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of death in women worldwide. The search for novel compounds with antitumor activity, with less adverse effects and higher efficacy, and the development of methods to evaluate their toxicity is an area of intense research. In this study we implemented the preparation and culture of breast tumor explants, which were obtained from precision-cut breast tumor slices. In order to validate the model, the effect of different concentrations of paclitaxel antineoplastic was analyzed and then the concentration of 20 µg/ml was selected for use as a reference control to evaluate the activity of caffeic acid, ursolic acid and rosmarinic acid, which are compounds that have been identified in natural products, act as chemopreventive, they are antioxidants and inhibit the growth of some breast cancer cells. Using the Krumdieck[®] and Brendel-Vitron[®] tissue slicers, precision-cut tissue slices were prepared from breast cancer samples; from these slices, 4mm explants were obtained and incubated with the selected compounds. Viability was assessed by Alamar Blue assay, LDH release, and histopathological criteria. Results showed that the viability of the explants cultured in the presence of paclitaxel (positive control) decreased significantly ($P < 0.05$); however, tumor samples responded differently to each compound. When the explants were coincubated with paclitaxel and compounds, a synergic effect was observed. This study shows that *ex vivo* culture of breast cancer explants offers a suitable alternative model for evaluating natural or synthetic compounds with antitumor properties within the complex microenvironment of the tumor.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de mortalidad en el mundo, con 8.2 millones de muertes y 14.1 millones de nuevos casos registrados durante 2012 solamente. El cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres y posee la morbilidad y mortalidad más elevadas (Ferlay 2013; W.H.O. 2012).

Las terapias convencionales contra el cáncer incluyen la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Aunque este último es ampliamente utilizado, en la mayoría de los casos produce efectos secundarios indeseables, quimiorresistencia y/o recurrencia del cáncer después del tratamiento (Vera-Ramirez et al. 2013). Así, diferentes grupos de investigación se centran en la búsqueda de nuevos fármacos o compuestos contra el cáncer (Morrissey et al. 2010; Du et al. 2011), mientras que otros están desarrollando metodologías para la evaluación de estos nuevos compuestos (Kang et al. 2009; Wang et al. 2012; Yang et al. 2012).

Uno de los enfoques actuales para la investigación de nuevos compuestos antineoplásicos o quimiopreventivos se basa en la investigación de productos naturales. Esto es debido a que algunos de estos compuestos inhiben la proliferación celular y promueven la apoptosis en diversos tipos de células tumorales, incluyendo las células de cáncer de mama. Además, es bien sabido que aproximadamente el 60% de los fármacos administrados en el tratamiento del cáncer se aislaron a partir de productos naturales (Alonso-Castro et al. 2011; Bai et al. 2011; Berdowska et al. 2013). Para el propósito de este estudio, se seleccionaron tres compuestos de origen natural que poseen actividades antitumorales y quimioprotectores, es decir, ácido cafeico (CA), ácido ursólico (UR), y ácido rosmarínico (RS). Estos compuestos bioactivos se encuentran presentes en frutas, verduras, plantas medicinales y especies culinarias (Stagos et al. 2012; Kaefer y Milner 2008; Link et al. 2010).

Por otro lado, la actividad antitumoral y los mecanismos implicados en la inhibición de la carcinogénesis mediada por nuevos compuestos con potencial antineoplásico deben ser evaluados y validados utilizando sistemas que admitan extrapolar sus efectos en seres humanos. Por lo tanto, es importante utilizar modelos experimentales que permitan analizar de manera adecuada y reproducible los efectos de los compuestos bioactivos en muestras de tumores donde se conserve microambiente tumoral. Conde et al., sugieren que para estudiar el comportamiento de los tumores es necesario mantener o reconstituir un ambiente similar del tumor *in situ* (Conde et al. 2012).

Desde el punto de vista experimental, una manera de preservar la arquitectura del tejido con poca o ninguna manipulación es a través del cultivo organotípico de tejidos tumorales intactos y frescos. Las rebanadas de tejido, son uno de los métodos utilizados recientemente que cumplen con estas características, con la ventaja adicional de que representan un sistema intermedio entre los modelos *in vivo* e *in vitro* y que ofrecen una nueva perspectiva a los resultados obtenidos con las líneas celulares. Las rebanadas de tejido contienen prácticamente todas las células del tejido en estudio, conservan la estructura histológica y en tres dimensiones (3D), con interacciones inter y extracelulares, componentes de la matriz celular, y, lo más interesante, capacidad metabólica.

Utilizando el cultivo organotípico *ex vivo* de explantes de cáncer de mama tratadas con ácido cafeico, ácido ursólico, ácido rosmarínico y paclitaxel (TX) encontramos que este modelo es un sistema alternativo para el estudio de la actividad contra el cáncer y/o evaluación del potencial sinérgico de los productos naturales. Los explantes cultivados conservan su morfología típica y viabilidad durante al menos 3 días. Con este método, un número suficiente de rebanadas y explantes se puede obtener a partir de cantidades mínimas de tejido, lo que permite el estudio de varios compuestos dentro de una sola muestra tumoral.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer de mama y agentes antineoplásicos

El cáncer es la principal causa de mortalidad a nivel mundial, se le atribuyen 8.2 millones de las defunciones ocurridas en el 2012. Según datos y predicciones de la Organización Mundial de la Salud, las muertes por cáncer seguirán aumentando en todo el mundo y alcanzarán la cifra de 19.3 millones en el 2025. Dentro de los tipos tumorales más frecuentes, el cáncer de mama es el de mayor morbilidad y mortalidad en mujeres, en el 2012, aproximadamente 1.7 millones de mujeres fueron diagnosticadas y 521,000 defunciones ocurrieron como resultado directo de esta enfermedad (Ferlay 2013; W.H.O. 2012).

En México, en el año 2008 ocurrieron 35,303 defunciones, de éstas, 4,871 (13.8%) fueron debidas al cáncer de mama. En el año 2012 el cáncer de mama también fue la principal causa de morbilidad hospitalaria en las mujeres (30.8%), siendo aquellas de 40 a 59 años las más propensas a padecerlo (INEGI, 2014). El cáncer de mama tiene una tasa de mortalidad femenina de 14 (por cada 100 mil mujeres); por ello, en nuestro país se le considera un importante problema de salud pública ya que con el tiempo, la mortalidad y el número de casos se han incrementado paulatinamente. A partir de 2006 ocupa el primer lugar como causa de muerte por neoplasias malignas en las mujeres de 20 años en adelante y ha desplazado de esta posición al cáncer cérvicouterino. En la población mexicana, alrededor de 25 mujeres son diagnosticadas de cáncer mamario diariamente. El problema comienza a partir de los 20 años y se agrava con la edad, presentándose las tasas de mortalidad más altas de los 65 años en adelante (Fernández et al. 2011).

En la actualidad existen diversos agentes activos que ayudan a prolongar y mejorar la calidad de vida de las pacientes con cáncer de mama en etapas avanzadas. La quimioterapia convencional para este padecimiento incluye doxorubicina, epirubicina,

ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, capecitabina, metotrexato, gemcitabina, vinorelbina, navelbina, paclitaxel, docetaxel y cisplatino, así como terapias blanco más específicas como transtuzumab. La terapia hormonal incluye antagonistas de receptores de estrógeno e inhibidores de aromatasas. Sin embargo, a pesar de las nuevas estrategias farmacológicas, la progresión de la enfermedad y la muerte de los pacientes son aún los principales problemas que resultan de la resistencia adquirida e intrínseca propia de cada individuo. Aunque los tratamientos de quimioterapia producen un rango de respuesta clínica en un 60 a 70% de los pacientes, la supervivencia a 5 años permanece por debajo del 50% y son raros los casos que se curan por completo. La hipótesis que se ha planteado es que la respuesta de cada individuo hacia los fármacos difiere en base a su diversidad genética, a la heterogeneidad intratumoral, al desarrollo de sub-clonas celulares dentro de los tumores que exhiben fenotipos divergentes y a perfiles distintos de expresión de genes aún dentro del mismo tumor (Gerlinger et al. 2012).

Además de la respuesta diferencial al tratamiento por parte de cada paciente con cáncer, la quimiorresistencia hacia fármacos que se utilizan en quimioterapia, así como la heterogeneidad intratumoral, son algunos de los factores que obstaculizan el tratamiento exitoso del cáncer de mama. Los mecanismos patogénicos son complejos e involucran una gran variedad de vías y rutas de señalización, muchos de ellos aún desconocidos (Gerlinger et al. 2012; Ge et al. 2012; Marquette y Nabell 2012). Por estas razones, en los últimos años se ha planteado la posibilidad de ofrecer tratamientos quimioterapéuticos personalizados de acuerdo al fenotipo y características de cada paciente con cáncer (Pirnia et al. 2006; Conde et al. 2012; Kamiyama et al. 2013). Los modelos que permitan identificar diferencias individuales en la respuesta del tumor a los agentes terapéuticos podrían hacer posible diseñar regímenes específicos para cada paciente, aumentando la probabilidad de una respuesta favorable (Reinhold y Tilgen 2003).

2.1.1 Paclitaxel (antineoplásico de referencia)

El taxoide paclitaxel conocido por su nombre de marca original, Taxol[®], representa el fármaco antineoplásico de primera línea más importante para el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas. En 1971, el paclitaxel fue purificado e identificado como el constituyente activo de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia* (Pazdur et al. 1993; Lister-Sharp et al. 2000). Su mecanismo de acción se basa en la estimulación del ensamblaje de microtúbulos de las células expuestas a paclitaxel e impide la formación del huso mitótico; esto interfiere con la división celular e induce la muerte celular (Miller y Sledge 1999).

2.2 Compuestos naturales

2.2.1 Ácido cafeico (CA)

Los fenoles dietéticos son antioxidantes *in vitro*; dos importantes grupos de éstos que se encuentran en los alimentos son los flavonoides y los ácidos cinámicos. Los principales flavonoides en los alimentos son los flavonoles y catequinas, mientras que el representante principal en la dieta de ácidos cinámicos es el ácido cafeico (figura 1). Se ha demostrado que el ácido cafeico inhibe la metilación del ADN en células humanas de cáncer de mama y pudiera favorecer la reducción del riesgo de contraer este cáncer (Lee y Zhu 2006). En los alimentos, este ácido se conjuga principalmente con ácido quínico, que produce ácido clorogénico (ácido 5-cafeoilquínico). El café es la principal fuente de ácido clorogénico en la dieta, es decir, 1 L de café proporciona 500 a 800 mg de ácido clorogénico, lo que corresponde a 250 a 400 mg de ácido cafeico (Olthof et al. 2003). No obstante, los estudios epidemiológicos han sido inconsistentes y pocos estudios han examinado la asociación de la ingesta de café en la carcinogénesis de mama de manera concluyente (Gierach et al. 2011). Sin embargo, este ácido no sólo está presente en el café, sino también en una gran cantidad de vegetales y frutas (Stagos et al. 2012).

Viveros-Valdez et al., en el 2010, encontraron que los ácidos fenólicos aislados de *Hedeoma drummondii* (poleo) poseen efecto antiproliferativo *in vitro* contra las líneas celulares de cáncer MCF-7 (mama) y HeLa (cáncer cervicouterino), siendo el ácido cafeico el más potente. En células humanas de cáncer de mama MCF-7 y MAD-MB-231 se demostró que el tratamiento con ácido cafeico inhibe parcialmente la metilación de la región promotora del gen RAR-beta; a través de un mecanismo no-competitivo, y esta inhibición fue en gran parte debido al incremento en la formación de S-adenosil-L-homocisteína (SAH, un potente inhibidor de la metilación del ADN), como resultado de la O-metilación de estos catecoles dietéticos mediada por la catecol-O-metiltransferasa (COMT). El valor de IC₅₀ del ácido cafeico encontrado en estos ensayos fue de 2.3 μM (Lee y Zhu 2006). Por otro lado, a bajas concentraciones (1-2 nM), se ha encontrado que el ácido cafeico actúa como inhibidor de MMP-9 y -2 involucrados en la invasión por células tumorales y metástasis, mediante la inhibición de la actividad de NF-kB en células Hep3B de hepatocarcinoma (Jin et al. 2005; Chung et al. 2004).

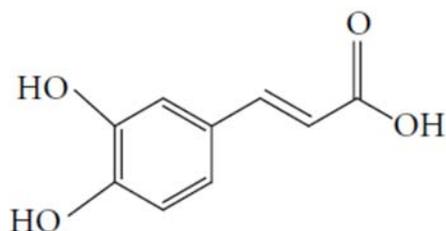


Figura. 1. Ácido cafeico (C₉H₈O₄). PM = 180.16 (Kampa et al. 2004).

2.2.2 Ácido ursólico (UR)

El ácido ursólico, un triterpenoide pentacíclico (figura 2), ha sido investigado por su potencial como agente quimiopreventivo contra el cáncer de mama. Abunda en la piel de varias frutas, por ejemplo, en las manzanas (*Malus sp*), peras, ciruelas y arándanos (*Vaccinium macrocarpon*); en hierbas medicinales y en plantas como el saúco, menta, romero, lavanda, orégano, tomillo o albahaca; en la corteza de *A. adstringens* (cuachalalate), *Polylepis racemosa* (quinual), así como en las partes aéreas de *Erica andevalensis* (brezo minero) (Singletary et al. 1996; Bishayee et al. 2011).

El primer estudio sobre los efectos anti-cáncer de mama del ácido ursólico fue publicado por Es-Saady et al., en 1996, quienes lo obtuvieron de varias fuentes incluyendo *Calluna vulgaris* (brezo común). De acuerdo con este estudio, el ácido ursólico actuó como un potente inhibidor de la proliferación de células MCF-7, ejerciendo una respuesta citostática en la fase G1 del ciclo celular, seguido de la muerte celular (Martín-Cordero et al. 2001).

Se ha demostrado que este bioactivo exhibe efectos tumorocidas mediante la inducción de la apoptosis y la inhibición del consumo de oxígeno en células de adenocarcinoma mamario murino MCAIV y células humanas de carcinoma de mama BT-20 (Lee et al. 2001). También se ha encontrado que el ác. ursólico induce apoptosis, la escisión de PARP, y también la disminución de la proteína Bcl-2 apoyando la hipótesis de que este compuesto induce la muerte celular programada a través de la vía mitocondrial intrínseca. Adicionalmente, se ha mostrado que se une al receptor de glucocorticoides (GR) y lo transloca hacia el núcleo, sugiriendo su potencial como agente anticancerígeno a través de la modulación de receptores de glucocorticoides (Kassi et al. 2009).

Recientemente, se ha observado que este compuesto posee efectos supresores, dependientes de la dosis y el tiempo, sobre la migración y la invasión de células MDA-MB-231 las cuales son altamente metastásicas en concentraciones no citotóxicas. Este efecto se ha asociado con la inhibición de JNK, Akt y del blanco mamífero de la rapamicina (mTOR) y la reducción de NF-kB y p65 en el núcleo, lo que conduce a regulación negativa de la expresión de MMP-2 y uPA (Yeh et al. 2010). Shan et al., en el 2011 reportaron que el ácido ursólico ejerce efectos antitumorales en células cancerosas con multi-resistencia, mostrando una inhibición significativa en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MCF-7/ADR en una manera dependiente de la concentración y del tiempo. Además encontraron una disminución en la expresión de Bcl-2 y Bcl-xL dependiente de la concentración.

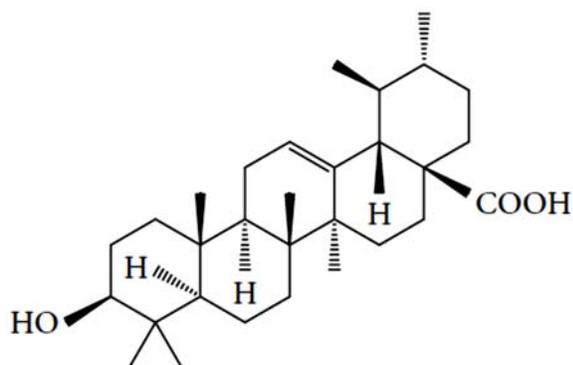


Figura. 2. Ácido ursólico (C₃₀H₄₈O₃). PM = 456.68 (Bishayee et al. 2011).

2.2.3 Ácido rosmarínico (RS)

El ácido rosmarínico es un éster del ácido cafeico y el ácido 3,4-dihidroxifeniláctico (figura 3). Es un importante compuesto bioactivo de naturaleza fenólica, el cual fue aislado por primera vez de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero) y más tarde de otras plantas de la familias Labiatae y Boraginaceae (Shekarchi et al. 2012). Estudios han reportado que esta molécula presenta actividad antioxidante, antitumoral y antimutagénica analizadas en ratones Swiss (Furtado et al. 2008; Sharmila y Manoharan 2012); y se le ha propuesto como un agente quimiopreventivo (Link et al. 2010; Venkatachalam et al. 2011).

El efecto del ácido rosmarínico sobre la proliferación celular en células MCF-7 fue medido mediante la técnica de MTT encontrando un efecto citotóxico mayor al de otros compuestos analizados (Paluszczak et al. 2010).

En otros estudios se examinó la citotoxicidad de dos extractos, que contenían ácido rosmarínico, sobre líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-361, MDA-MB-453 y células HeLa), mostrando actividad antiproliferativa significativa hacia las líneas celulares de cáncer de mama humano. *In vitro* las actividades antitumorales fueron acompañados por una importante fracción de células apoptóticas de todas las líneas celulares después del tratamiento con los extractos (Stanojković et al. 2010).

Además de su efecto antitumoral, el ácido rosmarínico puede inducir la apoptosis e inhibir la metástasis de células MDA-MB-231BO de cáncer de mama y ser un buen candidato para un nuevo enfoque terapéutico en el tratamiento de cáncer de mama (Xu et al. 2010).

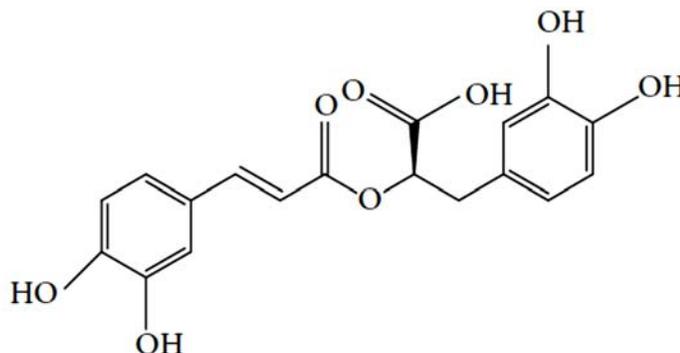


Figura. 3. Ácido rosmarínico (C₁₈H₁₆O₈). PM = 360.33 (Shekarchi et al. 2012).

2.3 Evaluación de la citotoxicidad

La actividad antitumoral así como los mecanismos implicados en la inhibición de la carcinogénesis, tanto de antineoplásicos de patente, como de nuevos compuestos con potencial anticarcinogénico, deben ser evaluados y validados en modelos que sean lo más semejante a lo que ocurre en el humano. Debido a que los resultados obtenidos a partir de sistemas *in vitro* y con animales de experimentación no reflejan necesariamente lo que ocurre en los pacientes, en lo que se refiere a las funciones fisiológicas, metabolismo y farmacocinética de los compuestos y otros factores de elevada complejidad, es muy importante realizar estudios *ex vivo* que nos permitan observar los efectos de estos agentes en muestras de tumores, en las cuales el microambiente tumoral sea preservado (Yang et al. 2002).

2.3.1 Modelos de estudio del cáncer

Cada vez es más conocido que el desarrollo del cáncer y la respuesta a la terapia no sólo dependen de las alteraciones genéticas en la clona maligna sino también de las interacciones específicas entre las células tumorales y los componentes tisulares

circundantes, es decir, el microambiente del tumor. Todos los tejidos, y la glándula mamaria no podría ser la excepción, están constituidos por diferentes tipos de células y proteínas de la matriz extracelular. En el caso del tejido mamario, en una glándula normal, las células epiteliales lumbinales de los ductos están rodeadas por células mioepiteliales, las cuales están en contacto con una membrana basal. La membrana basal separa las células epiteliales del estroma circundante, el cual se encuentra altamente compartimentalizado y comprende más del 80% del volumen de la mama normal. De manera inversa, en el carcinoma se han perdido tanto las células mioepiteliales completamente diferenciadas, como su membrana basal intacta, y las células tumorales están en contacto directo con el estroma tumoral. En los últimos años, diversos estudios han mostrado que además de los factores intrínsecos, el microambiente determina la sensibilidad de las células tumorales a la terapia citotóxica. Sin embargo la mayoría de la investigación preclínica en cáncer de mama se basa en cultivos celulares, los cuales no reflejan del todo la compleja arquitectura tisular de un tumor (van der Kuip et al. 2006).

2.3.2 Cultivos celulares

En los cultivos celulares *in vitro* se expande solamente un tipo de células tumorales, dependiendo de las condiciones del cultivo y, por lo tanto, representan a una sub-población del tumor entero. Además, la transformación genética y fenotípica que ocurre durante la expansión celular artificial es inevitable en los cultivos celulares de largo plazo (Speirs et al. 1998; Joshi et al. 2011). Al mismo tiempo, ciertos procesos celulares, como por ejemplo el crecimiento, diferenciación, motilidad, apoptosis, etc., pueden ser controlados por alteraciones físicas entre las células y su adhesión a la matriz extracelular que afectan el balance de la fuerza mecánica en la matriz extracelular, células y citoesqueleto (Ingber 2008). Las estrategias que modifican o alteran la fisiología del tumor sólido han mejorado la citotoxicidad de diversos agentes antineoplásicos debido a que las interacciones específicas entre células cancerosas y su ambiente (célula-célula y célula-matriz extracelular) contribuyen a los resultados de la quimioterapia (Croix et al. 1996; Sherman-Baust et al. 2003). Por ejemplo, Netti et al. (2000) mostraron que tumores con una red de colágeno bien definida son más resistentes

a la penetración de macromoléculas tales como IgG, comparados con tumores que exhiben pérdida de la red de colágeno. El tratamiento con colagenasa, permite la degradación del colágeno, aumentando el coeficiente de difusión de las moléculas, demostrando el papel del microambiente tumoral como barrera de la penetración de los medicamentos (Grant et al. 2006).

En el 2008, Sonnenberg et al., realizaron ensayos de citotoxicidad tanto en cultivos *in vitro* de fibroblastos asociados a carcinoma, como en cultivos *ex vivo* de rebanadas de tejido de cáncer de pulmón y de mama. Analizaron, mediante inmunohistoquímica, la proliferación y muerte celular después del tratamiento con paclitaxel y cisplatino a las 24 y 72 horas posteriores a la preparación de rebanadas de tejido. De acuerdo a sus resultados los fibroblastos asociados a carcinoma tienden a ser mucho menos sensibles a cisplatino cuando se encuentra dentro del microambiente tisular que cuando han sido aislados mediante digestión enzimática. Aunado a lo anterior, publicaciones recientes muestran que se ha subestimado la heterogeneidad intratumoral; por lo que, analizar la genómica tumoral a partir de los resultados provenientes de biopsias de una sola región del tumor presenta retos mucho mayores en el desarrollo de biomarcadores y personalización del tratamiento del cáncer. En el estudio que se refiere, se examinaron biopsias de carcinoma renal metastásico y se observó que una sola biopsia revela un promedio de 70 mutaciones somáticas, aproximadamente 55% de todas las mutaciones detectadas en todo el tumor. Solamente el 34% de todas las mutaciones somáticas en el espécimen estuvo presente en todas las regiones (31% si se incluyen muestras pre-tratamiento y metástasis), indicando que una sola muestra no representa el escenario completo del tumor (Gerlinger et al. 2012).

2.3.3 Modelos *ex vivo*: rebanadas de tejidos

Según Conde et al., en el 2012, para estudiar el comportamiento tumoral *ex vivo* es necesario mantener o reconstituir un ambiente muy similar al del tumor *in situ*. Desde el punto de vista experimental, una forma de conservar la arquitectura tisular, sin tanta manipulación, es cultivar directamente el tejido tumoral intacto y fresco. Uno de los

métodos más utilizados recientemente con este fin es el uso de rebanadas de tejido, un sistema que ofrece una nueva perspectiva a los resultados obtenidos con líneas celulares.

Las rebanadas de tejido representan un modelo experimental que consiste en preparar “en fresco”, a partir de diferentes órganos, cortes de tejidos que presentan, literalmente hablando, la forma de una rebanada (ver figura 4), con diámetro y grosor similar entre sí (5-10 mm y 200-800 μm , respectivamente) y se pueden cultivar, también dependiendo del tejido, hasta por 10 días. Este grosor es muy importante ya que permite mantener viable el tejido por distintos periodos de tiempo y por lo tanto, la difusión de nutrientes, fármacos y anticuerpos.

Consideradas por los expertos como un mini-órgano que contiene prácticamente todas las células del tejido en estudio, las rebanadas conservan la estructura histológica y tridimensional del órgano del cual se obtienen, al mismo tiempo que mantienen las interacciones inter y extracelulares, elementos de la matriz celular, y lo más interesante, que conservan su capacidad metabólica. Por estas razones, representan una herramienta adecuada y conveniente para el estudio de procesos multicelulares (De Graaf et al. 2010). Este sistema brinda la ventaja de una mayor reproducibilidad en los experimentos realizados con un mismo órgano, aunque también permite trabajar simultáneamente con diferentes órganos provenientes de un mismo animal, pudiéndose obtener, en ambos casos, una gran cantidad de rebanadas que pueden ser cultivadas en condiciones controladas, disminuyéndose al mismo tiempo, el número de animales de experimentación. Su preparación se extiende a diversos órganos, tales como riñón, hígado, pulmón, corazón, cerebro e intestino. Las rebanadas de tejidos han sido utilizadas principalmente para estudiar el metabolismo y toxicidad de xenobióticos (Possidente et al. 2011; Olinga y Schuppan 2013), biotransformación de fármacos, efectos inducidos sobre expresión genética en órganos y análisis morfológicos, entre otros (De Kanter et al. 2005; Kasper et al. 2005). También se ha descrito recientemente su utilización y validación como modelo de infección por *Entamoeba histolytica* (Carranza-Rosales et al. 2010; Carranza-Rosales et al. 2012). Para su preparación se

utilizan rebanadores mecánicos, total o parcialmente automáticos como el de Krumdieck[®], el de Brendel Vitron[®] y más recientemente, el Leica VT1200[®]. Para mantener el tejido viable, durante el proceso de obtención de rebanadas se utilizan amortiguadores fisiológicos a los cuales se les suministra de manera constante aireación con gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂).

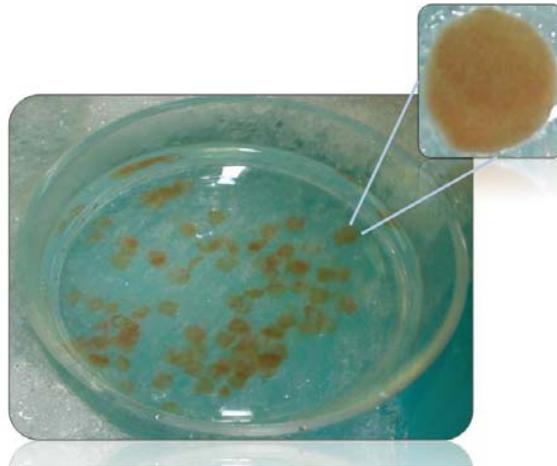


Figura 4. Fotografía de rebanadas de hígado preparadas utilizando el rebanador Brendel-Vitron[®].

La preparación de rebanadas de tejido es una técnica que permite generar y cultivar rebanadas que están constituidas de 10 a 50 capas de células, dependiendo del grosor y el origen del tejido. Esta metodología es ampliamente utilizada en estudios toxicológicos. Por ejemplo, las rebanadas de tejido hepático han sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos de América como un modelo para el estudio del metabolismo de fármacos (Rots et al. 2006).

2.3.3.1 Rebanadas de tejido tumoral

Al igual que las rebanadas que se obtienen a partir de órganos o tejidos “sanos”, las rebanadas de tejido tumoral representan un sistema de cultivo tridimensional *ex vivo*. Actualmente, diversos grupos de investigación apoyan la idea de utilizar este tipo de cultivos tridimensionales como una herramienta para el análisis de agentes terapéuticos.

Como se ha mencionado en las secciones precedentes, desde la década de los 80's y hasta la fecha, las rebanadas de hígado, riñón, pulmones, corazón, intestino, próstata, cerebro y páncreas provenientes de distintas especies animales, incluyendo humanos, se han utilizado en muy diversas investigaciones, prueba de ello es que en PUBMED se pueden encontrar cientos de trabajos recientes en los cuales se demuestra el gran potencial de esta metodología. Sin embargo, fue hasta el año 2004 que se reportó por primera vez su aplicación en investigación con tejido tumoral. A continuación se mencionan la mayor parte de artículos publicados en los cuales se utilizan rebanadas de tumores.

En el primer reporte que se tiene, Barbosa et al. (2004), utilizaron rebanadas de tumor mamario para investigar el efecto de la vitamina D3 en la regulación de marcadores asociados a un fenotipo celular invasor. En ese mismo año, Kirby et al. (2004) utilizaron rebanadas de tumores de ovario e hígado para evaluar la eficacia terapéutica y especificidad replicativa de adenovirus utilizados como vectores en terapia génica. Los autores concluyeron que el cultivo de rebanadas normales y tumorales es ideal para realizar ensayos preclínicos de toxicidad e infectividad de adenovirus. En un trabajo similar, pero utilizando rebanadas de tumor mamario, Stoff-Kahlili et al. (2005) evaluaron vectores adenovirales como alternativa terapéutica en cáncer de mama y encontraron que el promotor adenoviral CXCR-4 es adecuado en la viroterapia del cáncer de mama mediada por adenovirus. Rots et al. (2006), demostraron también que la metodología de rebanadas de tumor mamario es excelente para estudiar especificidad y eficiencia de genes y replicación viral en terapia con virus oncolíticos.

En el 2006, Kern et al., utilizaron rebanadas de tumores hepáticos de humanos para demostrar el potencial antineoplásico de meloxicam[®], un inhibidor selectivo de COX-2 directamente sobre el tejido tumoral. Mestres et al. (2006) describieron un método que combina la utilización de rebanadas de tumor mamario y chips de silicón equipados con sensores electroquímicos para estudiar la sensibilidad de rebanadas de tumor mamario incubadas en presencia de paclitaxel. Por otra parte, Van der Kuip et al.

(2006) utilizaron también rebanadas de tumor mamario y las incubaron en presencia de dosis variables de paclitaxel, ellos determinaron que las rebanadas se mantienen viables por al menos 4 días en cultivo y que la viabilidad disminuyó de manera inversamente proporcional a la concentración de paclitaxel, con estos resultados, sugieren que esta técnica puede ser una herramienta válida para investigar la resistencia y efectividad de agentes antineoplásicos en un gran número de muestras de tejido tumoral.

Otros autores han utilizado rebanadas de tejido tumoral mamario de ratones transgénicos para estudiar la estructura tridimensional y las interacción estroma-epitelial en la biología tumoral, así como, la respuesta a fármacos, citocinas y entorno extracelular bajo condiciones definidas, concluyendo que este modelo representa un sistema para el análisis molecular *ex vivo* que simula estrechamente el escenario *in vivo* (Parajuli y Doppler, 2009).

En 2009 Zimmermann et al., infectaron rebanadas de tumores hepáticos primarios y secundarios con diferentes cepas del virus del sarampión para estudiar la eficiencia de la infección. De acuerdo a sus resultados, el modelo es adecuado para realizar ensayos de pre-selección de agentes oncolíticos a partir de muestras individuales de tumores antes de realizar terapia viral. Por su parte, van Geer et al. (2009) utilizaron rebanadas de tumores pancreáticos de humanos para estudiar vectores para terapia génica; encontraron que las rebanadas pudieron ser infectadas y transducidas eficientemente por vectores adenovirales, y con menor eficiencia, por lentivirus. Los autores también reportaron que tanto las rebanadas tumorales, como de tejido normal se conservaron viables y con morfología aceptable durante 6 días en cultivo y que todos los tipos de células pancreáticas se encontraban presentes en las mismas. Green et al. (2010) realizaron un ensayo piloto para cultivar tumores sarcomatosos de perros y gatos en dos medios de cultivo diferentes, con el objetivo de encontrar las condiciones adecuadas de cultivo y poder probar agentes quimioterapéuticos *ex vivo*.

En otro reporte, Weiland et al. (2011) utilizaron rebanadas de tumores hepáticos humanos y disminuyeron experimentalmente los niveles de ATP adicionando fructosa para desviar una vía metabólica y corroborar si este hecho induce protección contra la toxicidad del TNF- α , un agente que es capaz de destruir células cancerosas, pero que se utiliza limitadamente debido a su elevada hepatotoxicidad. Según los autores, la privación de ATP mediada por fructosa protege al hígado y puede ser una alternativa para el tratamiento del cáncer hepático con TNF- α . Recientemente, distintos grupos de investigadores resaltan las ventajas y facilidad práctica que tienen sobre los cultivos de líneas celulares, los cultivos organotípicos, como los de rebanadas de tejido tumoral mamario.

Otro modelo *ex vivo* que resulta útil son los explantes de tejidos, al igual que las rebanadas de tumores se consideran un sistema organotípico tridimensional que mantiene las células en su ambiente original así como la citoarquitectura de su estroma, mantienen la interacción entre los tipos celulares heterogéneos que comprenden tanto tejido normal como tumoral y contienen los elementos de la matriz extracelular (Shimizu et al. 2011). Joshi et al. (2011) propusieron un método nuevo que consiste en utilizar explantes tumorales sin disociar para evaluar los efectos del tratamiento con antineoplásicos. Utilizaron muestras de glioblastoma multiforme las cuales son disectadas en bloques tumorales de 10 mm de diámetro, incubadas y sometidas a tratamiento antitumoral. Una de las limitaciones de este modelo es el periodo de tiempo de tratamiento relativamente corto.

Pirnia et al. (2006) reportaron el cultivo *ex vivo* de explantes de cáncer de pulmón de células no pequeñas que mantuvieron tanto la viabilidad como la capacidad proliferativa por 5 días. Así mismo, Hass et al. (2009) encontraron que al cultivar explantes de cáncer de mama a largo plazo es posible producir células epiteliales tumorales que expresan los biomarcadores celulares CD24, CD44 y CD227, inclusive cuando son obtenidas al día 462 del cultivo, concluyendo que este tipo de cultivos pueden representar una oportunidad de estudiar alteraciones metabólicas y funcionales,

la caracterización de biomarcadores y ampliar el conocimiento de la progresión tumoral, entre otras posibles aplicaciones.

Tanto para la preparación de rebanadas de tejidos como de explantes no se utilizan enzimas proteolíticas y por consiguiente, el parénquima queda localmente intacto, además de que se conservan la estructura histológica tridimensional, las interacciones celulares y las interacciones con la matriz extracelular, por lo que se considera que el microambiente tumoral también se mantiene intacto. Diversos reportes de investigación apoyan la idea de utilizar el cultivo de tejido *ex vivo* como una herramienta para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al impacto social y económico del cáncer de mama a nivel mundial y en México, así como la respuesta diferencial de cada paciente a los tratamientos convencionales, es importante la investigación de nuevas drogas o compuestos de origen natural o sintético, que pudieran ser utilizados en el tratamiento de los tipos más comunes de cáncer, así como desarrollar métodos que permitan evaluar *ex vivo* su eficacia sobre tejidos tumorales de humanos. Por lo anterior, nos propusimos implementar el cultivo organotípico de explantes de tumor mamario para estudiar la citotoxicidad tisular de compuestos de origen natural en muestras de pacientes con cáncer de mama con la finalidad de contribuir en la búsqueda de alternativas terapéuticas contra el cáncer.

4. HIPÓTESIS

Las rebanadas de tumor mamario representan un modelo adecuado para analizar *ex vivo* el efecto de productos naturales y sintéticos sobre la viabilidad tumoral.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Implementar la obtención y cultivo de rebanadas de tejido tumoral mamario de muestras de pacientes con cáncer de mama para analizar el efecto de productos naturales sobre su viabilidad.

5. 2. Objetivos particulares

1. Implementar la preparación y cultivo de rebanadas de tejido tumoral mamario.
2. Estandarizar en rebanadas de tejido tumoral y normal las condiciones de ensayo para las técnicas de inmunohistoquímica, Azul Alamar y liberación de LDH.
3. Determinar el efecto sobre la viabilidad tumoral mediante la medición de parámetros bioquímicos e histopatológicos en las rebanadas control y expuestas a los agentes bioactivos de origen natural (ácidos ursólico, cafeico y rosmarínico) y paclitaxel.
4. Analizar el efecto sobre los marcadores bioquímicos e histopatológicos de las rebanadas co-incubadas con mezclas de antineoplásico/bioactivo natural.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Agentes bioactivos

El ácido cafeico, ácido ursólico, ácido rosmarínico y paclitaxel se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Se prepararon stocks a una concentración de 10 mg/ml de cada bioactivo, utilizando como diluyente DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), se filtraron y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

6.2 Colecta de muestras tumorales

Este protocolo se sometió a aprobación por parte de la Comisión Nacional de Investigación en Salud del I.M.S.S., así como de los Comités de Ética y Bioseguridad del mismo Instituto. Las pacientes fueron seleccionados por los oncólogos clínicos de acuerdo a los criterios prevalentes en el servicio respectivo de quimioterapia, en estricto apego a las Normas Institucionales, La Ley General de Salud de México, y de acuerdo a la Declaración de Helsinki. Se utilizaron tejidos en fresco seleccionados *in situ* por un patólogo. Se incluyeron muestras de tumores primarios de glándula mamaria provenientes de biopsia incisional, tumorectomía o mastectomía, manejadas con técnica estéril y además se seleccionó del mismo espécimen muestra representativa de tejido mamario negativo (control). A todas las pacientes se les explicó detalladamente los objetivos del estudio y se les solicitó su participación mediante un instrumento de consentimiento informado verbal.

6.3 Población de estudio

Se colectaron 17 especímenes durante la cirugía de pacientes femeninas derechohabientes del I.M.S.S. de la Unidad Médica de Alta Especialidad #23 y # 25, Delegación Nuevo León, con diagnóstico histopatológico de cáncer de mama. La técnica de muestreo fue no probabilístico por criterio.

6.3.1 Criterios de selección de la muestra

6.3.1.1 Criterios de inclusión

1. Muestras representativas de cáncer de mama invasor localmente avanzado en etapas clínicas IIA, IIB, IIIA y IIIB, según la clasificación de Woodward et al. (2003) para la American Joint Committee on Cancer, de mujeres mayores de 18 años que aceptaron participar con consentimiento informado. 2. Pacientes con diagnóstico histológico de carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante. 3. Sin tratamiento oncológico previo.

6.3.1.2 Criterios de exclusión

1. Pacientes que estén cursando con embarazo. 2. Tumores secundarios o recidivantes. 3. Otros tipos de diagnósticos histológicos: sarcomas, linfomas, patologías inflamatorias, etc. 4. Pacientes bajo terapia de reposición o con antecedente de quimioterapia. 5. Muestras de tejido tumoral insuficiente para realizar los explantes de rebanadas y los análisis correspondientes. 6. Muestras con necrosis extensa que impida su proceso y análisis adecuado.

6.4 Procesamiento de las muestras

Inmediatamente después de la resección quirúrgica, se tomó un fragmento del tejido para el diagnóstico histopatológico de rutina; otro fragmento se almacenó por criopreservación y otro se procesó en fresco para la elaboración de rebanadas de tejido tumoral. Los fragmentos de tejidos para este último fin fueron seleccionados mediante examen macroscópico en campo quirúrgico por un patólogo; para ser transportados asépticamente en un recipiente de vidrio debidamente etiquetado con medio de cultivo DMEM/F12 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) sin suero a 4°C hacia el laboratorio de Cultivos Organotípicos del CIBIN para la preparación de rebanadas y explantes de tumor, su posterior cultivo y exposición a los tratamientos. Las muestras fueron identificadas por un número de folio consecutivo para control interno. En la figura 5 se ejemplifica la estrategia general mediante un diagrama esquemático.

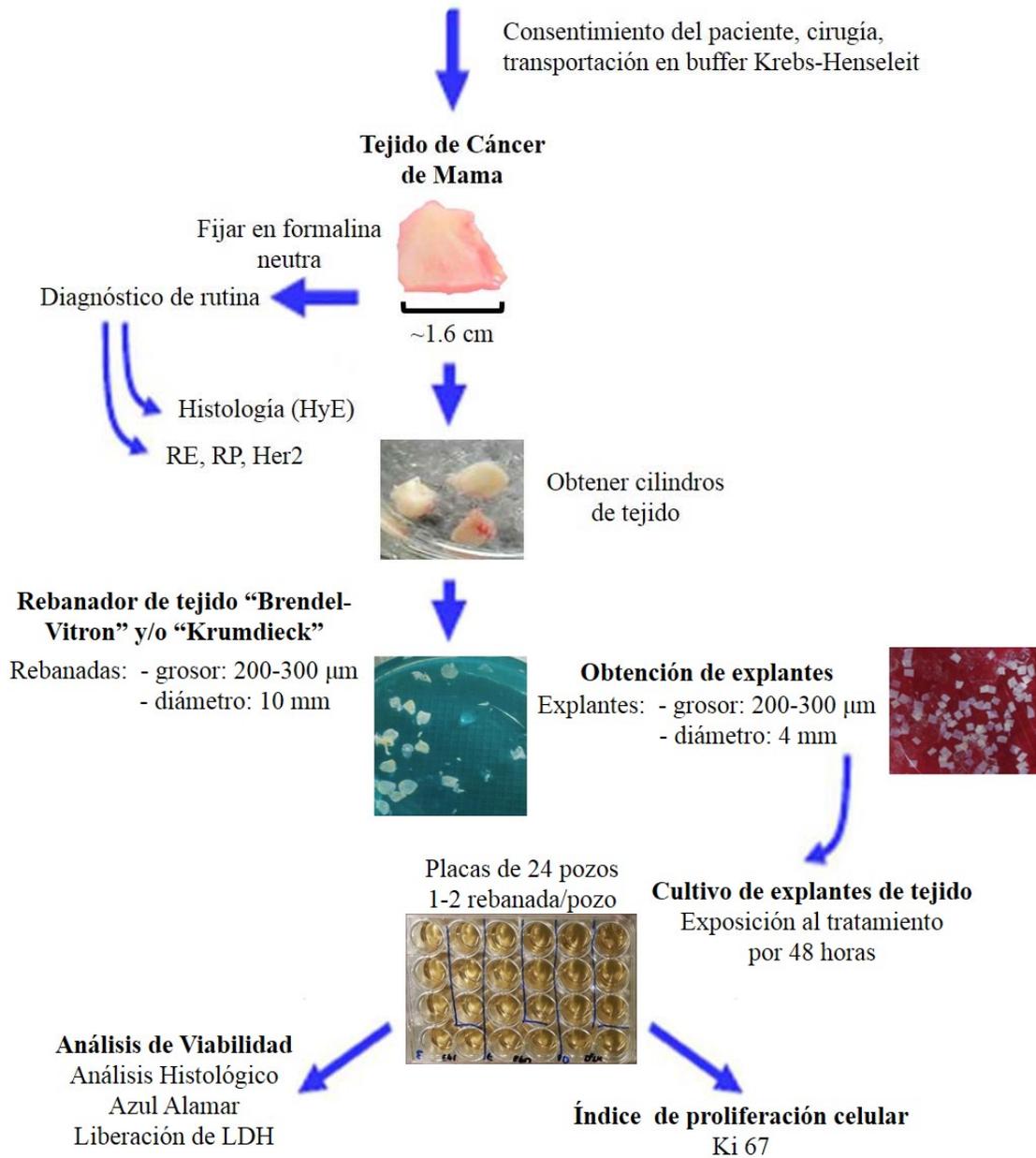


Figura. 5. Diagrama esquemático de la metodología general del estudio.

6.5 Preparación de rebanadas y explantes de tejido tumoral

A partir de la muestra tumoral se obtuvieron “bocados” cilíndricos de 10 mm de diámetro y se prepararon rebanadas con 250-300 μm de grosor utilizando el rebanador Krumdieck (Alabama Research & Development, Munford, AL, USA) y/o el rebanador Brendel-Vitron (Vitron, Inc, Tucson Arizona, USA), con flujo constante de buffer Krebs- Henseleit bicarbonato (KB) (6.9 g NaCl, 0.36 g KCl, 0.13 g, KH_2PO_4 , 2.11 g NaHCO_3 , 4.50 g D-glucosa anhidra, 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.425 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua MilliQ, pH 7.4) a 4°C y una mezcla de O_2/CO_2 (95:5%). Las rebanadas se colectaron en el mismo buffer a 4°C y a partir de estas se prepararon explantes con diámetro de 4mm y 250–300 μm de grosor con la finalidad de optimizar la cantidad de tejido disponible para cada ensayo y homogenizar el tamaño de los tejidos. Los explantes se colocaron en microplacas de 6 pozos (Corning Incorporated, New York, USA), conteniendo medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, una mezcla de insulina-tranferrina-selenio, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina bovina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina y 25mM de glucosa (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Las microplacas se pre-incubaron por 1 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 /95% aire, en agitación constante a 25 rpm. El tiempo transcurrido entre la escisión de tumor y la incubación *ex vivo* de los explantes no excedió de 2 horas. Además, para cada muestra se transfirieron 3-5 explantes recién preparados a un frasco con formol neutro al 10%, para el proceso histológico y el análisis inmunohistoquímico, estas muestras se refirieron como de tiempo cero (T0h). Todo el proceso de obtención de rebanadas y explantes se realizó bajo condiciones asépticas y con materiales y soluciones estériles.

6.6 Viabilidad tisular

Para confirmar que las muestras tumorales permanecieran viables durante el tiempo completo de experimentación, la viabilidad de los explantes de tumor se determinó a diferentes tiempos antes de probar el efecto antineoplásico del ácido cafeico, ácido ursólico, y ácido rosmarínico. Para analizar esto, cuatro explantes fueron colocados en microplacas de 24 pozos con 1 ml de medio DMEM/F12 suplementado e incubados por cuatro días a 37°C, 5% CO_2 /95% aire y con agitación constante de 25 rpm.

El medio de cultivo se cambió cada 24 h por 96 h y la viabilidad, proliferación y morfología se analizaron cada 24 h.

6.7 Tratamiento con paclitaxel y compuestos bioactivos

Después de 1 h de pre-incubación, los explantes fueron transferidos a microplacas de 24 pozos con 1 ml de DMEM/F12 suplementado, y se les adicionaron los siguientes tratamientos: 5, 10, 15, y 20 $\mu\text{g/ml}$ de paclitaxel (antineoplásico de referencia, control positivo), 11-33 $\mu\text{g/ml}$ de ácido cafeico, 20-60 $\mu\text{g/ml}$ de ácido rosmarínico y 20-60 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ursólico, y las mezclas de éstos con el paclitaxel. Estas concentraciones se seleccionaron en base a las IC_{50} reportadas en líneas celulares la literatura (Viveros-Valdez et al. 2010; Kassi et al. 2009; Neto et al. 2000) y a los ensayos preliminares. El grupo control (100% de viabilidad) consistió en explantes sin tratar, incubados solamente con medio de cultivo. Posteriormente, las microplacas con los explantes y sus tratamientos correspondientes se incubaron por 48 h 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 /95% aire y agitación constante a 25 rpm.

6.8 Viabilidad metabólica. Azul Alamar

El efecto de los tratamientos con ácido cafeico, ácido ursólico y ácido rosmarínico sobre la viabilidad de los explantes de tejido tumoral se determinó mediante el ensayo de reducción del Alamar Azul. El Azul alamar (AB) es un indicador de oxidación reducción no tóxico de color azul (resazurina) no fluorescente que es reducido por la actividad metabólica de las células a resorufina de color rosa, altamente fluorescente. Las células vivas metabólicamente activas reducen el microambiente (color rosa), mientras que las células muertas o inactivas mantienen el ambiente oxidado (color azul).

Después de 48 h de incubación con los tratamientos, para medir la actividad metabólica del tejido, los explantes se colocaron en 500 μl de medio DMEM/F12 con Azul Alamar 10% (v/v) adquirido de Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Después de 4

h de incubación a 37°C bajo las condiciones descritas anteriormente, se colectaron 100µl de medio de cada muestra por triplicado y se transfirieron a una microplaca de 96 pozos. Los valores de fluorescencia se leyeron utilizando un lector de placas de fluorescencia (Synergy™ HT Multinode Microplate Reader de BioTek) a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de 590 nm de emisión. El porcentaje de viabilidad relativa al control fue calculada utilizando el calculador fluorométrico para ensayos de azul alamar de AbD Serotec® (<http://www.abdserotec.com/colorimetric-calculatorfluorometric-alamarblue.html>).

6.9 Citotoxicidad. Liberación de LDH

Otra forma de evaluar la viabilidad de los explantes tratados con los compuestos y los controles sin tratar, fue midiendo la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en los sobrenadantes del medio de cultivo, de acuerdo a lo reportado por Evdokimova et al. (2002). El ensayo de LDH se basa en la liberación de la enzima citosólica LDH a partir de las células con daño en sus membranas plasmáticas (Gurunathan et al. 2013) y por ende, la citotoxicidad inducida por el ácido cafeico, ácido ursólico y ácido rosmarínico sobre los explantes de tumor puede determinarse cuantitativamente midiendo la actividad de esta enzima. La enzima liberada fue determinada utilizando el analizador químico clínico Architect C400 (Abbott). Los resultados se normalizaron con el peso de los explantes y se expresan en veces el control sin tratar.

6.10 Proliferación celular. Expresión de Ki 67

Para un estudio adecuado por inmunohistoquímica las muestras de los explantes se colocaron lo más rápido posible en formol amortiguado al 10% y con fijación mínima de 2 h y máxima de 12 h para evitar la sobrefijación. Posteriormente se realizó el proceso de la técnica histológica hasta obtener cortes histológicos de 4-5 µm de espesor que fueron montados en laminillas cargadas positivamente; se utilizaron con controles positivos y negativos (controles de calidad) para los marcadores de estudio.

Mediante la metodología Dako LSAB System-HRP® (Dako North America, Inc. (Carpinteria, CA, USA) para cortes histológicos se estudió la expresión de la proteína Ki 67, que es expresada en las células proliferativas y ha sido usada como un marcador de proliferación celular en tumores sólidos. La expresión de este marcador es nuclear, y el índice de proliferación se definió como sigue: bajo: expresión en $\leq 10\%$ de las células; intermedio: expresión en 10-20% de las células; y alto: expresión en $\geq 20\%$ de las células (Veronese et al. 1993). El procedimiento se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para determinar el porcentaje de células positivas para Ki 67 se utilizó un objetivo 40x. Se analizaron de 3 a 7 campos al azar para cada rebanada.

6.11 Marcadores de receptores hormonales

El análisis de receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP) y Her2 se realizó mediante la metodología LSAB+SYSTEM-HRP de DAKO® North America, Inc. (Carpinteria, CA, USA), la cual se basa en la alta afinidad que tienen la estreptavidina y la avidina por la biotina para formar un complejo con el anticuerpo secundario biotinilado, al final todo el complejo es detectado mediante la reacción con diamino bencidina (DAB) y posterior contraste con hematoxilina. El procedimiento se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Los receptores de estrógenos y de progesterona son positivos cuando se expresan como tinción nuclear en más de 1% de células neoplásicas y uno de los métodos que se recomienda para su evaluación es el propuesto por Allred (Harvey et al. 1999; Hammond et al. 2010). El sistema de Allred para medir los receptores hormonales se calcula añadiendo dos números; el primero expresa el porcentaje de células positivas en el tumor (0, ninguna; 1 $< 1\%$; 2 para 1% a 10%; 3 para 11% a 33%; 4 para 34% a 66%; y 5 para 67% a 100%). El segundo número expresa la intensidad de la tinción (1, débil; 2, moderado; y 3 fuerte), obteniendo una calificación máxima de 8 con un punto de corte para considerar positivo de 3.

Para Her2 se utiliza la clasificación del score 0 al 3 que corresponde a la intensidad de la reacción en la membrana celular (Wolff et al. 2007). Se consideran como negativos a todos los casos que se les dio un score (0-1+): no se identifica tinción o ésta es débil e incompleta en al menos 10% de las células neoplásicas. Indeterminado (2+): Tinción de membrana completa, débil a moderada en >10% de células neoplásicas o tinción intensa de membrana circunferencial en \leq 30% de las células. Positivo (3+): tinción de membrana intensa y uniforme en >30% de células neoplásicas con patrón en malla de gallinero. En aquellos casos donde el análisis por inmunohistoquímica de HER 2 sea interpretado como indeterminado (score 2), se mandó a analizar la expresión cuantitativa de Her2 mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando el Kit Her2 FISH pharmDX[®] de DAKO[®] (Cat. K 5331), el cual se aplica, entre otros, a tejidos de cáncer de mama incluidos en parafina. Para estandarizar las condiciones de trabajo, se siguieron las recomendaciones del fabricante.

6.12 Integridad morfológica. Análisis histopatológico

El análisis histopatológico se utilizó también para establecer, mediante criterios morfológicos, el efecto tóxico de los tratamientos sobre los explantes de tumor.

Después de la determinación de la viabilidad tisular (ensayo de alamar azul) sobre los explantes tratados y no tratados (control), esas mismas muestras se fijaron en formalina neutra al 10% por 12 h. Los explantes fijados en formol neutro al 10% fueron incluidos en parafina mediante la técnica histológica convencional. Se prepararon cortes de 4 μ m en un microtomo; los cortes se desparafinaron y rehidrataron para el análisis de rutina de preparaciones teñidas con hematoxilina y eosina (H y E), así como para los ensayos de inmunohistoquímica, detallados anteriormente.

El análisis microscópico de las laminillas teñidas con H y E fue realizado por una patóloga experimentada. Los parámetros morfológicos que se tomaron en cuenta fueron la presencia de necrosis, viabilidad de las células tumorales e inflamación. La integridad

de las células tumorales y control en las rebanadas cultivadas será diferenciada por comparación entre ellas. De manera complementaria se realizó el análisis histopatológico de los explantes de tiempo cero (explantes sin cultivar) para clasificar el tipo y grado de diferenciación histológica de cada tumor. Las preparaciones teñidas fueron observadas en un microscopio de luz de campo claro Zeiss Axiostar Plus. Fotografías representativas de todos los tratamientos fueron tomadas con una cámara Moticam de 5.0 MP.

6.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS versión 22.0. Los datos cuantitativos fueron expresados en valores medios \pm desviación estándar (D.E.). Las variables cuantitativas continuas en escala de Intervalo-Proporción, reducción de Azul alamar y liberación de LDH, fueron sometidas a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si presentaban distribución normal. Las diferencias en las variables cuantitativas continuas con distribución normal fueron analizadas con la prueba t de Student o con la prueba U de Man Whitney para variables con distribuciones no normales. Se tomó una $p < 0.05$ para considerar valores significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Preparación y cultivo de explantes de tejido tumoral.

Se colectaron 17 muestras de cáncer de mama humano con diagnóstico de adenocarcinoma ductal infiltrante con patrón no específico. De las cuales, cinco muestras se utilizaron para estandarizar y optimizar la preparación de rebanadas de tejido tumoral y de estas la obtención de explantes con tamaño y grosor definido (4mm de diámetro y 250-300 μm de grosor) para el cultivo *ex vivo* bajo condiciones controladas. Tres muestras más se utilizaron para determinar las concentraciones adecuadas de cada compuesto bioactivo de interés y del control paclitaxel. Dos muestras fueron descartadas debido al alto componente de necrosis, grasa y/o tejido fibroso presente. Cuatro muestras se eliminaron del estudio debido a que no cumplían los criterios de inclusión. Finalmente, tres muestras fueron incluidas en tres ensayos independientes para estudiar el efecto del ácido cafeico, ácido ursólico, ácido rosmarínico y paclitaxel sobre la viabilidad de los explantes de tejido tumoral. Estas muestras seleccionadas compartían características muy similares entre sí como se aprecia en la Tabla 1 donde se refieren los datos clínicos. Sin embargo, como se aprecia en la Tabla 2, cada muestra se encontraba dentro de una clasificación molecular diferente.

Tabla 1. Datos clínicos e histopatológicos de los pacientes

Paciente	Edad	Tipo histológico	Estado clínico	Tamaño	Lateralidad	APNP	IMC	Otros
A	50	Ductal infiltrante	T2N1M0	3cm	GMI	Tabaquismo	Obesidad GII	DM, HAS
B	59	Ductal infiltrante	T3N0M0	5cm	GMI	Negado	Obesidad GII	DM, HAS
C	41	Ductal infiltrante	T2N1M0	4cm	GMI	Tabaquismo	Sobrepeso	HAS

Tabla 2. Receptores hormonales y clasificación molecular

Receptores hormonales	Paciente A	Paciente B	Paciente C
RP	-	+	+
RE	-	+	+
HER2	+	+	-
Clasificación Molecular	Her2+	Luminal B	Luminal A

7.2 Viabilidad de los explantes de tumor

7.2.1 Viabilidad metabólica celular

La figura 6 muestra la viabilidad de los explantes de tejido tumoral a través del tiempo, analizada por el ensayo azul alamar. Los tejidos cultivados a las 48 h tuvieron $99.3\% \pm 3.1$ de viabilidad con respecto a la viabilidad inicial, corroborando que el metabolismo de los tejidos se mantiene sin alteraciones durante su cultivo al menos hasta las 48 h, determinando entonces que este tiempo era el óptimo para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad. A las 72 h se puede ver un ligero decremento en el porcentaje de la viabilidad, con un $84.7\% \pm 10.2$, y es hasta las 96 h donde se puede apreciar un descenso significativo de la viabilidad con un porcentaje de $55.1\% \pm 17.9$ ($P < 0.05$).

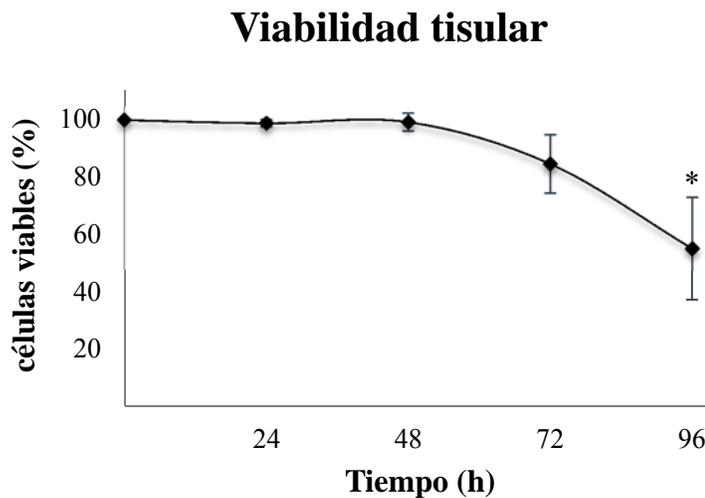


Figura 6. Curva de viabilidad de explantes de tejido tumoral mamario. Para determinar el tiempo óptimo para los experimentos con los compuestos bioactivos, los explantes fueron cultivados en medio DMEM/F12 suplementado por 24, 48, 72 y 96 h. La viabilidad se evaluó mediante el ensayo de Azul Alamar. Las barras representan las medias \pm desviación estándar de tres experimentos por triplicado. El asterisco (*) indica una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

7.2.2 Integridad morfológica: Análisis histopatológico.

Después de 96 h en cultivo, se encontró que la histología típica del tejido tumoral se preservó en los explantes tumorales. Como se muestra en la figura 7, en los explantes cultivados durante 24, 48, 72 y 96 h, las células neoplásicas retuvieron su morfología característica y actividad mitótica. Fue posible identificar microcalcificaciones, tejido conectivo fibroso, reacción del estroma desmoplásico, células inflamatorias y tejido adiposo; Además, se observaron células mitóticas en los puntos de todos los tiempos. Estos resultados (como se muestra en la figura 7) confirman que los explantes de cáncer de mama se mantuvieron viables y proliferando activamente durante las 96 h de cultivo.

7.2.3 Proliferación celular (Expresión de Ki 67 por inmunohistoquímica)

El índice de proliferación de los explantes cultivados fue mayor al 50% durante todos los tiempos de incubación analizados (24-72 h) al compararlo con el tejido normal

y el tejido tumoral (controles negativo y positivo, respectivamente). Este resultado corresponde a un alto índice de proliferación y sugiere que el tejido permanece viable y proliferando activamente durante las condiciones de cultivo *ex vivo* (ver figura 8).

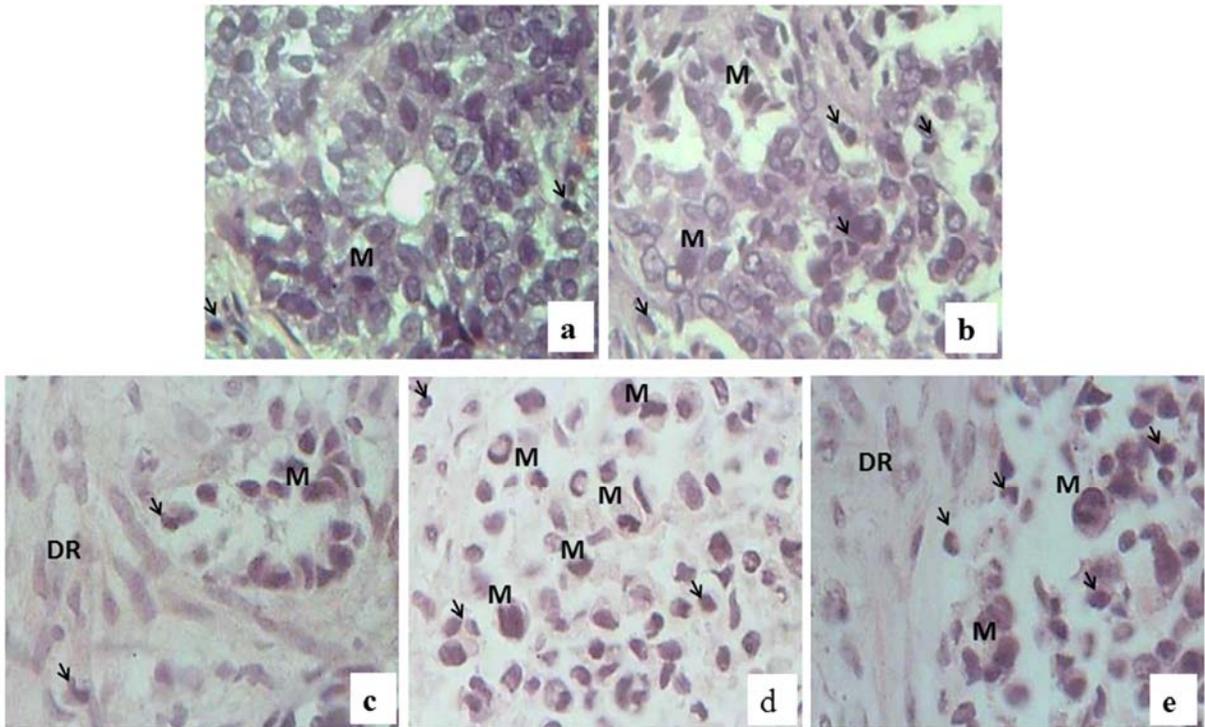


Figura 7. Integridad morfológica de los explantes de tejido tumoral cultivados *ex vivo*. Los hallazgos histopatológicos del tejido tumoral al tiempo cero (basal) y los tejidos cultivados durante los diferentes tiempos en medio DMEM/F12 suplementado mostraron que el tejido se mantiene viable. Esto al observar células en mitosis activa (M), reacción desmoplásica (DR) adyacente a las células tumorales, y la presencia de células inflamatorias (flechas). Todas estas características son típicas del tejido tumoral (a) 0 h, (b) 24 h, (c) 48 h, (d) 72 h y (e) 96 h en cultivo, respectivamente. Tinción HyE (40x).

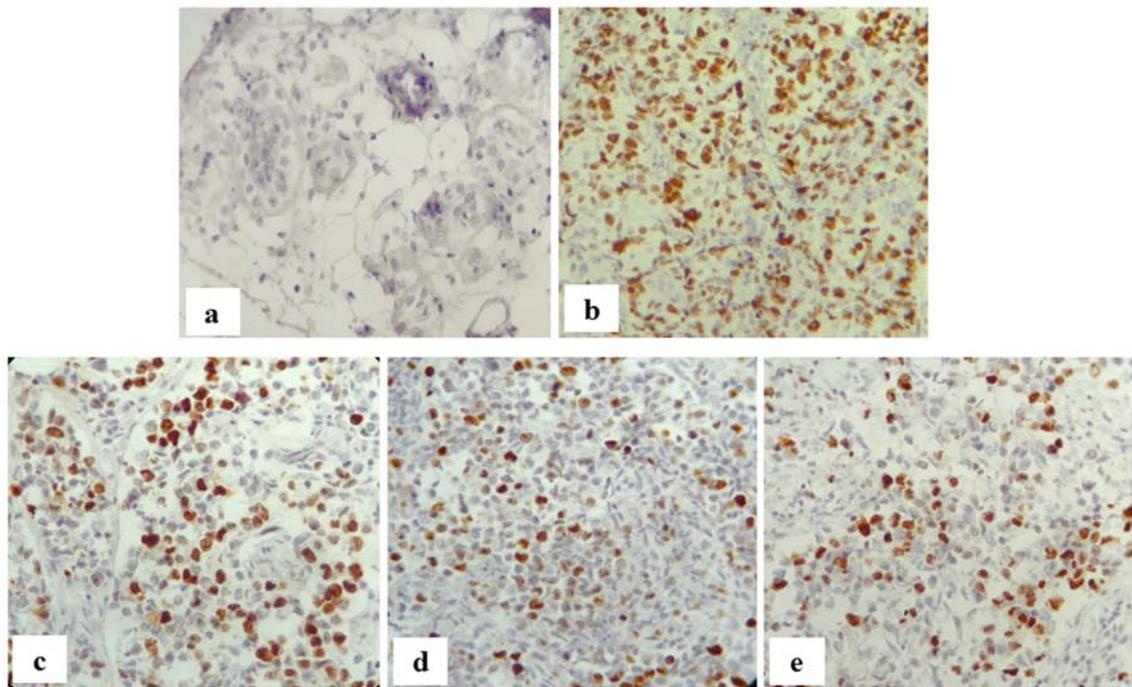


Figura 8. Expresión nuclear del marcador de proliferación Ki 67 en explantes de cáncer de mama cultivados. Imágenes representativas que muestran que más del 40% de las células neoplásicas expresan Ki 67 en todos los tiempos. El índice de proliferación es considerado como “alto” cuando >20% de las células son positivas para este marcador. (a) Tejido mamario normal (control negativo); (b) tumor mamario (control positivo); (c), (d) y (e) explantes de tejido tumoral cultivados por 24, 48 y 72 h, respectivamente. Tinción inmunohistoquímica (10x).

7.3 Efecto de los compuestos bioactivos y paclitaxel sobre explantes de tumor mamario

Con el fin de asegurarse de que los explantes de tumores de mama respondieran al tratamiento *ex vivo* con ácido cafeico, ácido ursólico y ácido rosmarínico, se evaluó primero la actividad metabólica de los explantes a las 48 h de incubación con distintas dosis de paclitaxel (5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$), obteniendo, como se esperaba, una curva dosis-respuesta de citotoxicidad, directamente proporcional a la concentración del paclitaxel (ver figura 9).

Tomando como base estos resultados se seleccionó la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ de paclitaxel, ya que redujo la viabilidad tumoral a menos del 50% ($P < 0.05$), para utilizarla en los ensayos (control positivo) como actividad antineoplásica de referencia.

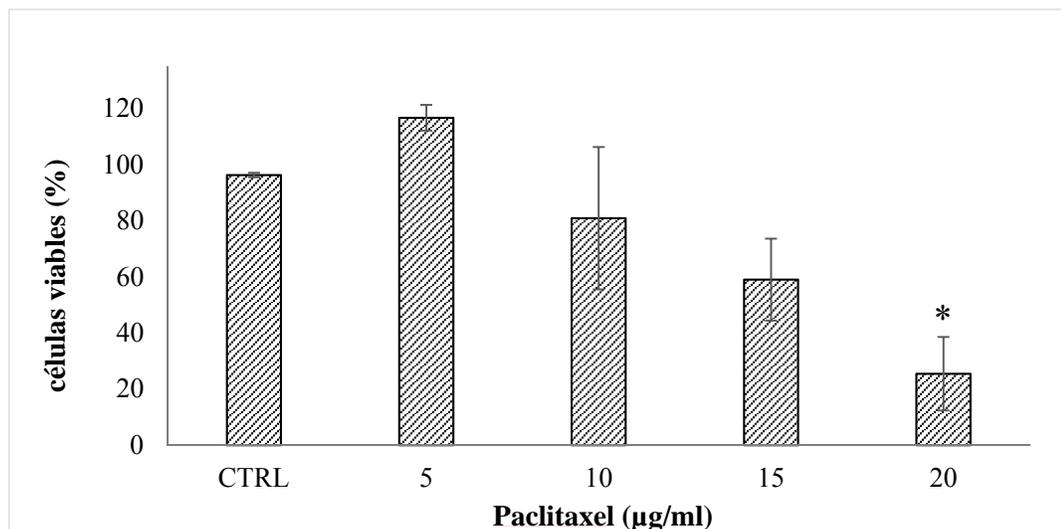


Figura 9. Efecto del paclitaxel sobre la viabilidad de explantes de tumor. Los explantes de tumor mamario fueron cultivados por 48 h con diferentes concentraciones de paclitaxel. La viabilidad se evaluó a los tiempos indicados utilizando el ensayo de Azul alamar. Las barras representan las medias \pm desviación estándar de tres experimentos por triplicado. El asterisco (*) indica una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

En el caso del efecto de los compuestos bioactivos sobre la viabilidad de los explantes de tumor mamario, las concentraciones iniciales para ácido cafeico, ácido ursólico y ácido rosmarínico fueron de 11-33, 20-60 y 20-60 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estas concentraciones no fueron citotóxicas ya que los explantes permanecieron viables y también se conservó la estructura histológica intacta. Debido a esto, fue necesario incrementar las concentraciones experimentales de ácido cafeico y ácido ursólico a 100 $\mu\text{g/mL}$ y de ácido rosmarínico a 120 $\mu\text{g/mL}$. Al comparar la estructura histológica de los explantes tumorales no cultivados (tumor original) con la de los explantes cultivados por 48 h sin ningún tratamiento, se observó neoplasia pobremente diferenciada con células neoplásicas sin patrón específico, las cuales mantuvieron su viabilidad. Sin embargo, cuando los explantes cultivados en presencia de paclitaxel solo y con las combinaciones de paclitaxel mas compuestos bioactivos, se observaron áreas

diseminadas de necrosis así como una marcada reducción (más del 40%) en la población de células neoplásicas (figura 10). Estos resultados sugieren un posible efecto antineoplásico de los compuestos bioactivos, reforzado cuando se combinan con paclitaxel.

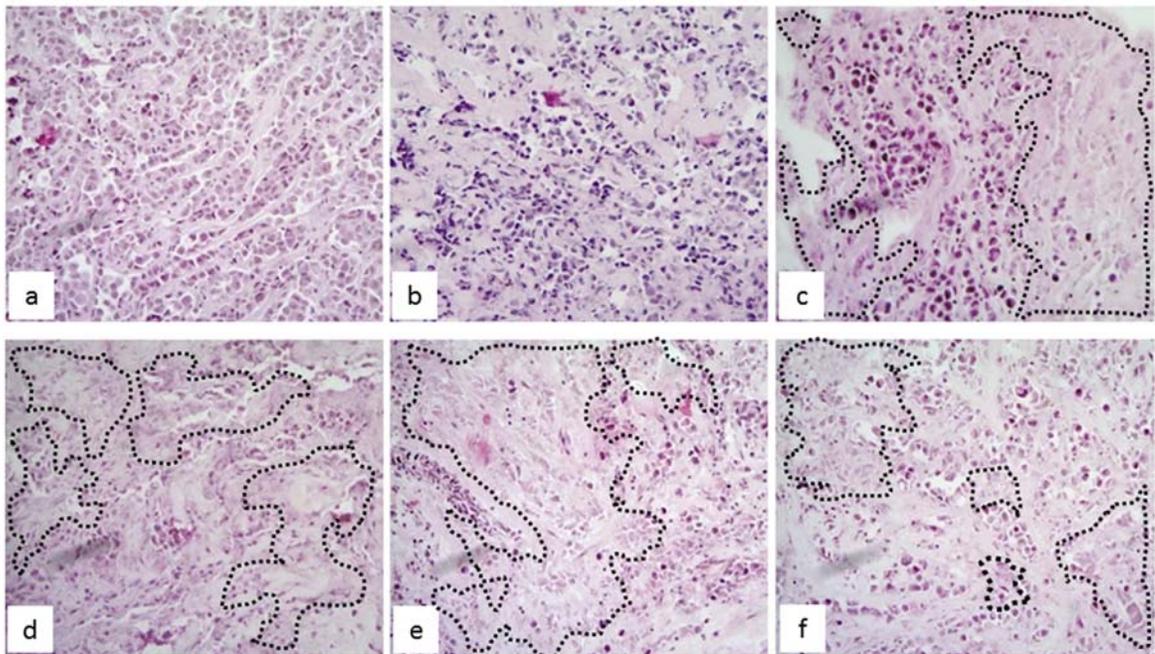


Figura 10. Efecto de los compuestos bioactivos y sus combinaciones con paclitaxel en cultivos de explantes de cáncer de mama. Los explantes del control a cero horas (a) y el control sin tratamiento cultivado durante 48 h (b) muestran neoplasia invasiva pobremente diferenciada sin evidencia de áreas de necrosis tumoral. Por el contrario, en explantes incubados con paclitaxel (c) y sus combinaciones con ácido cafeico (d), ácido rosmarínico (e), y ácido ursólico (f), se observó una respuesta patológica evidente, que se refleja principalmente como una disminución notable de las células neoplásicas (40-80%) que puede ser apreciada como áreas extensas de necrosis inducidas por tratamientos (líneas punteadas) Tinción HyE (10x).

Además, mediante el análisis de la actividad metabólica de los explantes cuando se incubaron con estas nuevas concentraciones, se observó, como se esperaba, que las muestras individuales de cada paciente respondieron de manera diferente a los compuestos ensayados. El ácido cafeico fue el más eficaz en el paciente A, reduciendo

la viabilidad tumoral a 67.2%, mientras que la combinación de paclitaxol + ácido cafeico disminuyó la viabilidad a 17,1%. Asimismo, el ácido cafeico fue el compuesto más activo contra el tumor del paciente B, en el que la viabilidad se redujo a 32.5%; también, la combinación con paclitaxel tuvo un efecto importante en la viabilidad, con una reducción a 20.2%. En contraste, ninguno de los compuestos tuvo un efecto citotóxico contra la muestra del paciente C; sin embargo, se observó una marcada reducción de la viabilidad cuando se ensayaron compuestos individuales combinados con paclitaxel. Interesantemente, todos los compuestos ejercieron un efecto sinérgico, mejorando la toxicidad tisular de paclitaxel en las tres muestras de tumor (figura 11).

Adicionalmente, la citotoxicidad del paclitaxel solo y de las combinaciones con compuestos bioactivos se evaluó a través de la liberación de la enzima citosólica LDH en los sobrenadantes de los medios de cultivo en el que se cultivaron los explantes tumorales. Como se muestra en los datos, la combinación de paclitaxel + ácido cafeico indujo un aumento de la LDH liberada de 1.42 y 1.80 veces en los explantes tumorales de los pacientes A y B, respectivamente, en comparación con el control no tratado. Para el paciente C, la combinación de paclitaxel + ácido rosmarínico indujo un incremento de 2.34 veces (figura 12). Estos valores fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

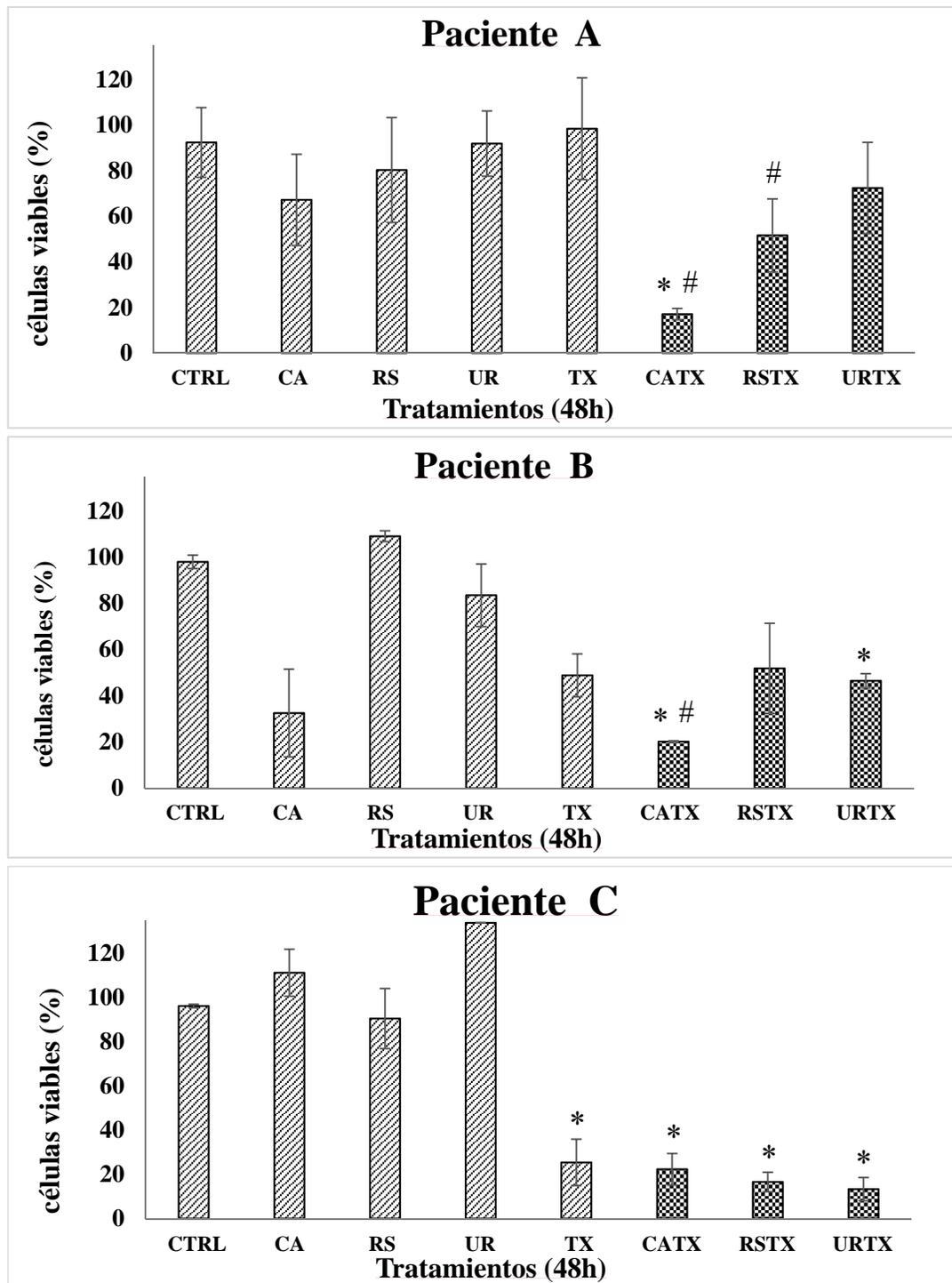


Figura 11. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la viabilidad de los explantes de tumor de tres muestras a las 48h de cultivo. (CTRL: control, CA: ácido cafeico, RS: ácido rosmarínico, UR: ácido ursólico TX: paclitaxel y las combinaciones CATX: paclitaxel + ácido cafeico, RSTX: paclitaxel + ácido rosmarínico, URTX: paclitaxel + ácido ursólico). Las barras representan las medias \pm desviación estándar de tres experimentos por triplicado. El asterisco (*) indica una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

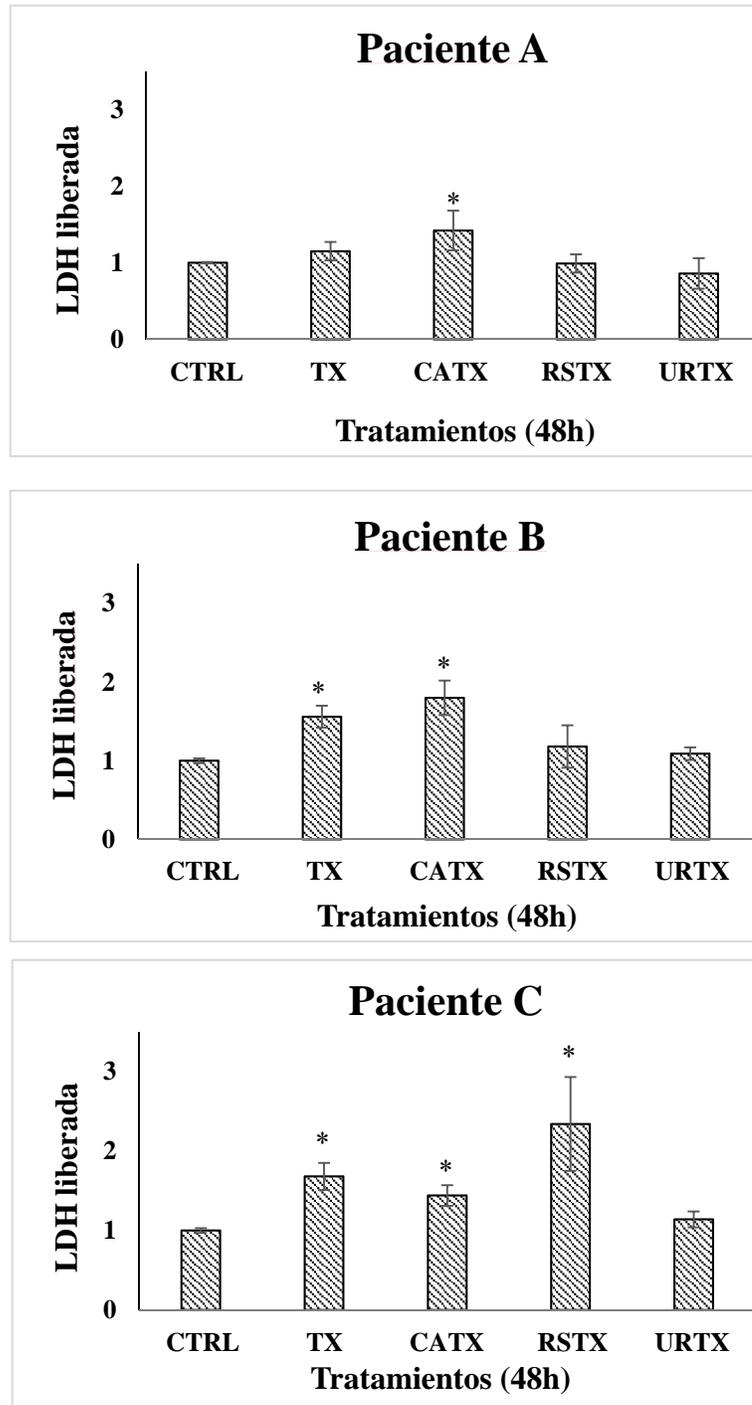


Figura 12. Efecto de las combinaciones de paclitaxel-compuestos bioactivos sobre la LDH liberada. (CTRL: control, CA: ácido cafeico, RS: ácido rosmarínico, UR: ácido ursólico TX: paclitaxel y las combinaciones CATX: paclitaxel + ácido cafeico, RSTX: paclitaxel + ácido rosmarínico, URTX: paclitaxel + ácido ursólico). Las barras representan las medias \pm desviación estándar de tres experimentos por triplicado. El asterisco (*) indica una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue demostrar el uso del cultivo organotípico *ex vivo* de explantes de tumor de mama humano como un modelo alternativo para la evaluación de compuestos naturales con potencial antineoplásico. La característica más importante de estos explantes es que se obtienen a partir de rebanadas de tejido tumoral mamario que poseen un tamaño y grosor definido. Este es un modelo interesante que permite el estudio de los diferentes aspectos del cáncer. Tiene todas las ventajas de las rebanadas de tejidos típicas y también contribuye a la disminución significativa en el número de animales utilizados en la experimentación (de Graaf et al. 2010; Carranza-Rosales et al. 2010). Además, permite la optimización de la cantidad de tejido disponible y favorece la realización de un gran número de ensayos que capturan muchos aspectos de la heterogeneidad y complejidad tumoral (Hickman et al. 2014). Una de las dificultades que enfrentamos durante la preparación de las rebanadas de tumor de mama fue la viscosidad o la consistencia muy blanda de algunos tumores; Así, con base en este hecho, dos de las 11 muestras fueron descartadas. Esta desventaja se correlacionó con lo reportado por otros investigadores (Diallo et al. 2011; Holliday et al. 2013).

Para estar seguros de que este sistema es confiable y adecuado para evaluar el efecto de estos compuestos bioactivos, el paso más crítico era mantener la viabilidad de los explantes durante las condiciones de cultivo *ex vivo* y durante el tratamiento posterior con estos compuestos. Para monitorizar la viabilidad, se utilizó el ensayo de AB, ya que es un método sencillo y asequible que permite la evaluación de la viabilidad celular mediante la adición de reactivo AB directamente al medio de cultivo. El compuesto activo de AB es la resazurina, que se reduce a resorufina a través del metabolismo mitocondrial en la vida las células. Además, el ensayo de AB no requiere pasos adicionales como otras pruebas de viabilidad, en las que es necesario lisar células o dañar las membranas con el fin de liberar el metabolito reducido (Pirnia et al. 2006; Horev-Azaria et al. 2013). Este ensayo proporciona mediciones fiables del número de células metabólicamente activas y es uno de los métodos más utilizados para evaluar la

proliferación celular. Otras ventajas incluyen su naturaleza homogénea, la estabilidad de la señal generada, alta sensibilidad, compatibilidad con los instrumentos de absorbancia o fluorescencia y diferentes modelos biológicos, y también la seguridad para el usuario y el medio ambiente (Ramirez et al. 2010; Rampersad 2012).

Los resultados de análisis histopatológico y azul alamar demuestran que tanto la actividad metabólica como la integridad morfológica se conservaron durante al menos 72 h (figuras 6 y 7). Por otro lado, el análisis inmunohistoquímico de Ki 67 mostró que la proliferación celular se mantuvo estable durante el período experimental. Ki 67 es un marcador de proliferación fuertemente asociado con las células en mitosis durante el ciclo celular (Yerushalmi et al. 2010). El índice de proliferación de las células de cáncer en los explantes cultivados fue >40% en todos los tiempos analizados, lo cual se considera "alto", según los criterios aceptados (ver figura 8) (Veronese et al. 1993) y es similar a los informes de otros autores, que llevaron a cabo pruebas de toxicidad selectiva en tejido de cáncer de mama y fueron capaces de mantener la viabilidad y la proliferación durante 24 h (Milani et al. 2010) y 96 h (van der Kuip et al. 2006; Sonnenberg et al. 2008) o hasta 7 días (Holliday et al. 2013). Con el fin de validar la utilidad del modelo, se incubaron los explantes de tumor mamario con diferentes concentraciones de paclitaxel, un fármaco antineoplásico bien conocido. Como era de esperar, una curva de dosis-respuesta se observó (figura 9). Con los resultados provenientes de tres muestras de tumor diferentes, se utilizaron 20 µg/ml como control positivo en los siguientes estudios.

Después, tres experimentos independientes se llevaron a cabo para poner a prueba el efecto de ácido cafeico, ácido ursólico, y ácido rosmarínico, que son compuestos de origen natural cuyas propiedades anticancerígenas y quimiopreventivos se han reportado anteriormente (Berdowska et al. 2013; Link et al. 2010; Lee y Zhu 2006; Yeh et al. 2010; Shan et al. 2011; Kampa et al. 2004; Bishayee et al. 2011; Paluszczak et al. 2010). Las concentraciones primeramente utilizadas se seleccionaron tomando como base de los valores de IC₅₀ reportados en líneas celulares (Viveros-

Valdez et al. 2010; Kassi et al. 2009; Neto et al. 2000); sin embargo, no se observó un efecto citotóxico sobre los explantes de tejido tumoral. Esto se puede atribuir a las diferencias entre los cultivos celulares *in vitro* y los explantes de tejido, porque en los explantes de tejido hay más de un estirpe de células interactuando entre sí y con los componentes de la matriz extracelular. Es bien conocido que la matriz extracelular y el microambiente tumoral protegen a las células neoplásicas de los agentes citotóxicos (Morin 2003). Cuando aumentamos las concentraciones de los compuestos bioactivos a 100 µg/ml para ácido cafeico y ácido ursólico y 120 µg/ml para ácido rosmarínico, se encontró que el ácido cafeico tuvo el mayor efecto, disminuyendo la viabilidad del tumor (figura 11). La concentración utilizada para ácido cafeico, así como los resultados observados, fue similar a los descritos por Chang et al. (2013), quien reportó que indujo la apoptosis y una disminución de la viabilidad en células de cáncer gástrico.

Con respecto al efecto sinérgico entre los compuestos bioactivos y paclitaxel, hay varios informes donde se utilizaron líneas celulares y combinaron agentes antineoplásicos con extractos de compuestos fenólicos, tales como UR y RS, que mejoraron la eficacia de los tratamientos. Estos resultados sugieren un gran potencial para el uso de compuestos naturales, cuando son añadidos junto a paclitaxel u otro agente antineoplásico, con el propósito de reducir la dosis, y los efectos secundarios asociados con la quimioterapia, sin sacrificar resultados terapéuticos (Luo et al. 2010; Li et al. 2010; Chen et al. 2010; González-Vallinas et al. 2013).

Además de los mencionados anteriormente, la realización de este tipo de estudios en modelos organotípicos *ex vivo*, como el utilizado en este trabajo, que asemejan más estrechamente el escenario *in vivo*, podría ser más útil para la extrapolación de los resultados en los seres humanos. Un factor importante a considerar es el tiempo de la administración del compuesto bioactivo al tejido, que puede ser hecho antes, durante, o después de la incubación con el agente antineoplásico. En nuestro caso, se coincubaron los explantes tumorales en presencia de compuestos naturales más paclitaxel basado en los puntos experimentales que definimos previamente; sin embargo, nuevos ensayos

pueden ser diseñados con un pre-tratamiento o post-tratamiento de tejidos con diferentes compuestos y agentes antineoplásicos.

Cuando se estudiaron combinaciones de ácido cafeico, ácido rosmarínico y ácido ursólico más paclitaxel, el ácido cafeico actuó sinérgicamente con este fármaco antineoplásico ya que la viabilidad fue menor que la obtenida con paclitaxel solo (figura 11). Este resultado es diferente de los reportados por Lin et al., quienes encontraron que el ácido cafeico a 100-150 μ M indujo un ligero aumento en la proliferación de células de cáncer de pulmón A549 y H1299 y que el pre-tratamiento de las células con este agente bioactivo las protege de la inhibición del crecimiento cuando se incuban con paclitaxel (Lin et al. 2012). Esta discrepancia en los resultados puede atribuirse a la diferencia de modelos biológicos (líneas de células *versus* a explantes tumorales), el pretratamiento utilizado, y también el hecho de que las concentraciones de ácido cafeico eran diferentes. Por otro lado, el ácido rosmarínico indujo un daño a la membrana más pronunciado cuando se coadministró con paclitaxel en la muestra del paciente C (figura 12). Aunque el sinergismo entre ácido cafeico y paclitaxel fue el más fuerte, para todas las combinaciones con los compuestos se observó una respuesta sinérgica en la reducción de la viabilidad tumoral en comparación con los compuestos solos (figura 11).

La relación entre la viabilidad y los datos de citotoxicidad fue discreta, ya que, aunque es posible observar que a menor porcentaje de viabilidad la liberación de LDH incrementa, los valores de LDH son relativamente bajos teniendo en cuenta que la viabilidad se redujo hasta un promedio de 18% en las sinergias entre paclitaxel + ácido cafeico en los pacientes A y B y paclitaxel + ácido rosmarínico en el paciente C; por lo tanto, se esperaría que los niveles de LDH fueran más elevados. Una posible explicación de este hecho es que una inactivación parcial de la enzima podría haber ocurrido en el medio de cultivo, como se ha reportado (Lash y Zalups 1992; Kendig y Tarloff 2007; Hohnholt et al. 2014; Tulpule et al. 2014). Otra posibilidad es que algunos compuestos naturales que tienen efectos antioxidantes protegen a las células y previenen la liberación de LDH. Por ejemplo, da Silva Morrone et al., encontraron que los extractos

de hojas de *Passiflora manicata* protegen del daño inducido por las especies reactivas de oxígeno, y la liberación de LDH se redujo significativamente en rebanadas de hígado de rata (da Silva et al. 2013). Por otro lado, Liu et al. (2015), encontraron que los lipopolisacáridos obtenidos a partir de *Lycium barbarum* inhibieron la elevación de las enzimas hepáticas, entre ellas, LDH en rebanadas de hígado expuestas a tetracloruro de carbono (Liu et al. 2015). Lo que podría explicar mejor los hallazgos encontrados en nuestro estudio debido a que estos autores también utilizaron rebanadas de tejido, mientras que, en los reportes mencionados anteriormente, se utilizaron cultivos celulares. Por otro lado, como se ha descrito en la introducción, los compuestos bioactivos que utilizamos tienen propiedades antioxidantes. Estos hallazgos sugieren que la inactivación o inhibición de LDH puede ser más común de lo que se pensaba, y es necesario ser más conscientes de esto en el momento de seleccionar la liberación de LDH como criterio de valoración de la citotoxicidad.

Hablando en conjunto, la variabilidad en los resultados obtenidos se debe posiblemente al hecho de que el tumor de cada paciente se comporta de manera diferente ante los medicamentos contra el cáncer, que a su vez se debe en parte a la extensa heterogeneidad intratumoral presente en cada tumor individual (Mestres et al. 2006; Gerlinder et al. 2012).

Con respecto a la última declaración, desde 1950, se han reportado respuestas diferenciales a los mismos fármacos en pacientes con el mismo tipo histológico de cáncer, incluyendo los efectos secundarios adversos (Eichelbaum et al. 1975). Estas diferencias se han estudiado a través de los años y hoy es un hecho aceptado que la respuesta individual a los fármacos (resistencia o sensibilidad) depende, entre otros factores, de los mecanismos de la enfermedad (farmacodinámica), el metabolismo de la droga en los pacientes (farmacocinética), la heterogeneidad intratumoral, y las complejas vías de señalización, muchas de las cuales aún se desconocen (Gerlinder et al. 2012; Ge et al. 2012; Marquette y Nabell 2012). Todas estas variaciones se reflejan en la heterogeneidad intratumoral debido a factores que causan la inestabilidad genómica

(Conde et al. 2012; Gerlinder et al. 2012). La heterogeneidad intratumoral y el microambiente tumoral se conservan en el modelo *ex vivo* propuesto, y es posiblemente una de las razones por las que la respuesta a los compuestos bioactivos es diferente en las muestras de los pacientes, incluso cuando tenían cáncer de mama en la misma etapa clínica, el mismo tipo histológico, pero diferente clasificación molecular.

9. CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados muestran que el cultivo organotípico de explantes de cáncer de mama, preparados a partir de rebanadas de tejido tumoral, ofrecen un modelo alternativo para la evaluación *ex vivo* de nuevos compuestos con potencial anticancerígeno, analizando incluso el posible efecto sinérgico con antineoplásicos conocidos.

10. PERSPECTIVAS

Este modelo abre las perspectivas para estudiar los efectos biológicos del tratamiento convencional y estrategias innovadoras en la investigación del cáncer de mama y para analizar diferentes mecanismos de la carcinogénesis en otros tumores humanos.

11. BIBLIOGRAFÍA

Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 133(3):945-972.

Bai KK, Chen FL, Yu Z, Zheng YQ, Li YN, Guo YH. 2011. Synthesis of [3 β -acetoxy-urs-12-en-28-oyl]-1-monoglyceride and investigation on its anti tumor effects against BGC-823. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 19(13):4043-4050.

Barbosa EM, Nonogaki S, Katayama ML, Folgueira MA, Alves VF, Brentani MM. 2004. Vitamin D3 modulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human breast carcinomas under organ culture. *Virchows Archiv* 444(2):175-182.

Berdowska I, Zieliński B, Fecka I, Kulbacka J, Saczko J, Gamian A. 2013. Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chemistry* 141(2):1313-1321.

Bishayee A, Ahmed S, Brankov N, Perloff M. 2011. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library* 16:980-996.

Carranza-Rosales P, Santiago-Mauricio G, Guzmán-Delgado NE, Vargas-Villarreal J, Lozano-Garza G, Ventura-Juárez J, Balderas-Rentería I, Morán-Martínez J, Gandolfi AJ. 2010. Precision-cut hamster liver slices as an *ex vivo* model to study amoebic liver abscess. *Experimental Parasitology* 126:117-125.

Carranza-Rosales P, Santiago-Mauricio MG, Guzmán-Delgado NE, Vargas-Villarreal J, Lozano-Garza G, Viveros-Valdez E, Ortiz-López R, Morán-Martínez J, Gandolfi AJ (2012). Induction of virulence factors, apoptosis, and cytokines in precision-cut hamster liver slices infected with *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology* 132(4):424-433.

Chang HT, Chen IL, Chou CT, Liang WZ, Kuo DH, Shieh P, Jan CR. 2013. Effect of caffeic acid on Ca²⁺ homeostasis and apoptosis in SCM1 human gastric cancer cells. *Archives of Toxicology* 87(12):2141-2150.

Chen GQ, Yao ZW, Zheng WP, Chen L, Duan H, Shen Y. 2010. Combined antitumor effect of ursolic acid and 5-fluorouracil on human esophageal carcinoma cell Eca-109 *in vitro*. Chinese Journal of Cancer Research 22(1):62-67.

Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JG, Kim, CH. 2004. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. The FASEB Journal 18:1670-1681.

Conde SJ, Luvizotto Rde A, de Sábio MT, Nogueira CR. 2012. Human breast tumor slices as an alternative approach to cell lines to individualize research for each patient. European Journal of Cancer Prevention 21(4):333-335.

Croix BS, Rak JW, Kapitain S, Sheehan C, Graham CH, Kerbel RS. 1996. Reversal by hyaluronidase of adhesion dependent multicellular drug resistance in mammary carcinoma cells. Journal of the National Cancer Institute 88:1285-96.

da Silva Morrone M, de Assis AM, da Rocha RF, Gasparotto J, Gazola AC, Costa GM, Zucolotto SM, Castellanos LH, Ramos FA, Schenkel EP, Reginatto FH, Gelain DP, Moreira JC. 2013. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models. Food and Chemical Toxicology 60:45-51.

De Graaf IA, Olinga P, Jager MH, Merema MT, de Kanter R, Van de Kerkhof E, Groothuis GM. 2010. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. Nature Protocols 5(9):1540-1551.

De Kanter R, Tuin A, Kerkhof VE, Martignoni M, Draaisma AL, Jager MH, Graaf IA, Meijer DK, Groothuis GM. 2005. A new technique for preparing precision-cut slices from small intestine and colon for drug biotransformation studies. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 51(1):65-72.

Diallo JS, Roy D, Abdelbary H, De Silva N, Bell JC. 2011. *Ex vivo* infection of live tissue with oncolytic viruses. Journal of Visualized Experiments (52):e2854.

Du GJ, Dai Q, Williams S, Wang CZ, Yuan CS. 2011. Synthesis of protopanaxadiol derivatives and evaluation of their anticancer activities. Anti-Cancer Drugs 22(1):35-45.

Eichelbaum M, Spannbrucker N, Dengler HJ. 1975. Proceedings: N-oxidation of sparteine in man and its interindividual differences. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 287 Supplement:R94.

Es-Saady D, Simon A, Jayat-Vignoles C, Chulia AJ, Delage C. 1996. MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts. *Anticancer Research* 16:481-486.

Evdokimova E, Taper H, Calderon PB. 2002. Effects of bacterial endotoxin (lipopolysaccharides) on survival and metabolism of cultured precision-cut rat liver slices. *Toxicology in Vitro* 16(1):47-54.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012: IARC Cancer Base No.11, *International Agency for Research on Cancer, Lyon, France* [Online], Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>.

Fernández CS, León AG, Herrera TM, Salazar SE, Sánchez DM, Alcalá OR, Barrón LE, González UL. 2011. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México, *Secretaría de Salud, México* [Online]. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DE_LOS_TUMORES_MALIGNOS_M%C3%A9xico.pdf

Furtado MA, Almeida LC, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. 2008. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research*. 657(2):150-154.

Ge WQ, Pu JX, Zheng SY. 2012. Clinical application of the adenosine triphosphate-based response assay in intravesicalchemotherapy for superficial bladder cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13(2):689-692.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal A, Swanton Ch. 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine* 366(10):883-892.

Gierach GL, Freedman ND, Andaya A, Hollenbeck AR, Park Y, Schatzkin A, Brinton LA. 2011. Coffee intake and breast cancer risk in the NIH-AARP diet and health study cohort. *International Journal of Cancer* 131(2):452-60.

González-Vallinas M, Molina S, Vicente G, de la Cueva A, Vargas T, Santoyo S, García-Risco MR, Fornari T, Reglero G, Ramírez de Molina A. 2013. Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacological Research* 72:61-68.

Grantab R, Sivananthan S, Tannock IF. 2006 The penetration of anticancer drugs through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells. *Cancer Research* 66:1033-1039.

Green N, Boothe DM, Smith A, Henderson R, Whitley E. 2010. *Ex vivo* viability of canine and feline sarcomas: a pilot study. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine* 11(2):E1-11.

Grosso SH, Katayama ML, Roela RA, Nonogaki S, Soares FA, Brentani H, Lima L, Folgueira MA, Waitzberg AF, Pasini FS, Góes JC, Brentani MM. 2013. Breast cancer tissue slices as a model for evaluation of response to rapamycin. *Cell and Tissue Research* 352(3):671-684.

Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, Jeyaraj M, Kim JH. 2013. Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells," *BioMed Research International* 2013:535796.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. 2010. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 134(6):907-922.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. 1999. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 17:1474-1481.

Hass R, Bertram C. 2009. Characterization of human breast cancer epithelial cells (HBCEC) derived from long term cultured biopsies. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research* 28:127-138.

Horev-Azaria L, Baldi G, Beno D, Bonacchi D, Golla-Schindler U, Kirkpatrick JC, Kolle S, Landsiedel R, Maimon O, Marche PN, Ponti J, Romano R, Rossi F, Sommer D, Uboldi C, Unger RE, Villiers C, Korenstein R. 2013. Predictive Toxicology of cobalt ferrite nanoparticles: comparative *in-vitro* study of different cellular models using methods of knowledge discovery from data. *Particle and Fibre Toxicology* 10:32.

Hickman JA, Graeser R, de Hoogt R, Vidic S, Brito C, Gutekunst M, van der Kuip H, Imi Prelect Consortium. 2014. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity *in vitro/ex vivo*. *Biotechnology Journal* 9(9):1115-1128.

Hohnholt MC, Blumrich EM, Dringen R. 2014. Multiassay analysis of the toxic potential of hydrogen peroxide on cultured neurons. *Journal of Neuroscience Research* 2014.

Holliday DL, Moss MA, Pollock S, Lane S, Shaaban AM, Millican-Slater R, Nash C, Hanby AM, Speirs V. 2013. The practicalities of using tissue slices as preclinical organotypic breast cancer models. *Journal of Clinical Pathology* 66(3):253-255.

INEGI. 2014. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer, *Instituto Nacional de Estadística y Geografía* [Online]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>

Ingber DE. 2008. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment? *Seminars in Cancer Biology* 18:356-364.

Jin UH, Chung TW, Kang SK, Suh SJ, Kim JK, Chung KH, Gu YH, Suzuki I, Kim CH. 2005. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clinica Chimica Acta* 362(1-2):57-64.

Joshi K, Demir H, Yamada R, Miyazaki T, Ray-Chaudhury A, Nakano I. 2011. Method for novel anti-Cancer drug development using tumor explants of surgical specimens. *Journal of visualized experiments* (53):e2846.

Kaefer CM, Milner JA. 2008. The role of herbs and spices in cancer prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19(6):347-361.

Kamiyama H, Rauenzahn S, Shim JS, Karikari CA, Feldmann G, Hua L, Kamiyama M, Schuler FW, Lin MT, Beaty RM, Karanam B, Liang H, Mullendore ME, Mo G, Hidalgo M, Jaffee E, Hruban RH, Jinnah HA, Roden RB, Jimeno A, Liu JO, Maitra A, Eshleman JR. 2013. Personalized chemotherapy profiling using cancer cell lines from selectable mice. *Clinical Cancer Research* 19(5):1139-1146.

Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kouimtzoglou E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research* 6(2):R63-R74.

Kang HJ, Lee SH, Price JE, Kim LS. 2009. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB in breast cancer cells and potentiates the growth inhibitory effect of paclitaxel in a breast cancer nude mice model. *The Breast Journal* 15(3):223-229.

Kasper HU, Dries V, Drebber U, Kern MA, Dienes HA, Schinrmacher P. 2005. Precision cut tissue slices of the liver as morphological tool for investigation of apoptosis. *In vivo* 19: 423-432.

Kassi E, Sourlingas TG, Spiliotaki M, Papoutsis Z, Pratsinis H, Aligiannis N, Moutsatsou P. 2009. Ursolic acid triggers apoptosis and Bcl-2 downregulation in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Investigation* 27(7):723-733.

Kendig DM, Tarloff JB. 2007. Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: implications for *in vitro* toxicology studies. *Toxicology in Vitro* 21(1):125-132.

Kern MA, Haugg AM, Eiteneuer E, Konze E, Drebber U, Dienes HP, Breuhahn K, Schirmacher P, Kasper HU. 2006. *Ex vivo* analysis of antineoplastic agents in precision-cut tissue slices of human origin: effects of cyclooxygenase-2 inhibition in hepatocellular carcinoma. *Liver International* 26(5):604-612.

Kirby TO, Rivera A, Rein D, Wang M, Ulasov I, Breidenbach M, Kataram M, Contreras JL, Krumdieck C, Yamamoto M, Rots MG, Haisma HJ, Alvarez RD, Mahasreshti PJ, Curiel DT. 2004. A novel *ex vivo* model system for evaluation of conditionally replicative adenoviruses therapeutic efficacy and toxicity. *Clinical Cancer Research* 10(24):8697-8703.

Lash LH, Zalups RK. 1992. Mercuric chloride-induced cytotoxicity and compensatory hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 261(2):819-829.

Lee I, Lee J, Lee YH, Leonard J. 2001. Ursolic acid-induced changes in tumor growth, O₂ consumption, and tumor interstitial fluid pressure. *Anticancer Research* 21:2827-2834.

Lee WJ, Zhu BT. 2006. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis* 27(2):269-277.

Li Y, Xing D, Chen Q, Chen WR. 2010. Enhancement of chemotherapeutic agent-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB using ursolic acid. *International Journal of Cancer* 127(2):462-473.

Lin CL, Chen RF, Chen JY, Chu YC, Wang HM, Chou HL, Chang WC, Fong Y, Chang WT, Wu CY, Chiu CC. 2012. Protective effect of caffeic acid on paclitaxel induced anti-proliferation and apoptosis of lung cancer cells involves NF-κB pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 13(5):6236-6245.

Link A, Balaguer F, Goel A. 2010. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology* 80(12):1771-1792.

Lister-Sharp D, McDonagh MS, Khan KS, Kleijnen J. 2000. A rapid and systematic review of the effectiveness and cost-effectiveness of the taxanes used in the treatment of advanced breast and ovarian cancer. *Health Technology Assessment* 4(17):1-113.

Liu Y, Cao L, Du J, Jia R, Wang J, Xu P, Yin G. 2015. Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in precision-cut liver slices *in vitro* and *in vivo* in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 169:65-72.

Luo T, Wang J, Yin Y, Hua H, Jing J, Sun X, Li M, Zhang Y, Jiang Y. 2010. (-)-Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma. *Breast Cancer Research* 12(1):R8.

Martín-Cordero C, Reyes M, Jesus M, Toro MV. 2001. Cytotoxic triterpenoids from *Erica andvalensis*. Zeitschrift fur Naturforschung Section C: Journal of Biosciences 56c:45-48.

Marquette C, Nabell L. 2012. Chemotherapy-resistant metastatic breastcancer. Current treatment options in oncology. Current Treatment Options in Oncology 13(2):263-75.

Mestres P, Morguet A, Schmidt W, Kob A, Thedinga E. 2006. A new method to assess drug sensitivity on breast tumor acute slices preparation. Annals of the New York Academy of Sciences 1091:460-469.

Milani C, Welsh J, Katayama ML, Lyra EC, Maciel MS, Brentani MM, Folgueira MA. 2010. Human breast tumor slices: a model for identification of vitamin D regulated genes in the tumor microenvironment. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 121(1-2):151-155.

Miller KD, Sledge GW Jr. 1999. Taxanes in the treatment of breast cancer: a prodigy comes of age. Cancer Investigation 17(2):121-136.

Morin PJ. 2003. Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture. Drug Resistance Updates 6(4):169-172.

Morrissey C, Gallis B, Solazzi JW, Kim BJ, Gulati R, Vakar-Lopez F, Goodlett DR, Vessella RL, Sasaki T. 2010. Effect of artemisinin derivatives on apoptosis and cell cycle in prostate cancer cells. Anti-Cancer Drugs 21(4):423-432.

Netti PA, Berk DA, Swartz MA, Grodzinsky AJ, Jain RK. 2000. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. Cancer Research 60:2497-503.

Neto CC, Vaisberg AJ, Zhou BN, Kingston DG, Hammond GB. 2000. Cytotoxic triterpene acids from the peruvian medicinal plant *Polylepis racemosa*. Planta Medica 66(5):483-484.

Olinga P, Schuppan D. 2013. Precision-cut liver slices: a tool to model the liver *ex vivo*. Journal of Hepatology 58(6):1252-1253.

Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB. 2003. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *The Journal of Nutrition* 133(6):1806-1814.

Paluszczak J, Krajka-Kuźniak V, Baer-Dubowska W. 2010. The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicology letters*. 192(2):119-25.

Parajuli N, Doppler W. 2009. Precision-cut slice cultures of tumors from MMTV-neu mice for the study of the *ex vivo* response to cytokines and cytotoxic drugs. *In Vitro Cellular Developmental Biology Animal* 45:442-450.

Pazdur R, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Cohen PR, Raber MN. 1993. The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). *Cancer Treatment Reviews* 19(4):351-386.

Pirnia F, Frese S, Gloor B, Hotz MA, Luethi A, Gugger M, Betticher DC, Borner MM. 2006. *Ex vivo* assessment of chemotherapy-induced apoptosis and associated molecular changes in patient tumor samples. *Anticancer Research* 26(3A):1765-72.

Possidente M, Dragoni S, Franco G, Gori G, Bertelli E, Teodori E, Frosini F, Valoti M. 2011. Rat intestinal precision-cut slices as an *in vitro* model to study xenobiotic interaction with transporters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79(2):343-348.

Rampersad SN. 2012. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassay. *Sensors* 12(9):12347-12360.

Ramirez CN, Antczak C, Djaballah H. 2010. Cell viability assessment: toward content-rich platforms. *Expert Opinion on Drug Discovery* 5(3):223-233.

Reinhold U, Tilgen W. 2003. Chemosensitivity testing in oncology. *Recent Results in cancer research*. Vol 161. Springer: Heidelberg, Germany, pp. 126-156.

Rots MG, Elferink MG, Gommans WM, Oosterhuis D, Schalk JA, Curiel DT, Olinga P, Haisma HJ, Groothuis GM. 2006. An *ex vivo* human model system to evaluate specificity of replicating and non-replicating gene therapy agents. *The Journal of Gene Medicine* 8(1):35-41.

Shan JZ, Xuan YY, Ruan SQ, Sun M. 2011. Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells *in vitro*. Chinese Journal of Integrative Medicine 17(8):607-611.

Sharmila R, Manoharan S. 2012. Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. Indian Journal of Experimental Biology 50(3):187-194.

Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Gohari AR, Hamedani MP. 2012. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. Pharmacognosy Magazine 8(29):37-41.

Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR. 2003. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. Cancer Cell 3:377-386.

Shimizu F, Hovinga KE, Metzner M, Soulet D, Tabar V. 2011. Organotypic explant culture of glioblastomamultiforme and subsequent single-cell suspension. In: Current Protocols in Stem Cell Biology, Bhatia M, Elefanty A, Fisher SJ (eds). John Wiley & Sons Inc: New Jersey, pp. 19: 3.5.1 - 3.5.9.

Singletary K, MacDonald C, Wallig M. 1996. Inhibition of rosemary and carnosol of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and *in vivo* DMBADNA adduct formation. Cancer Letters 104:43-48.

Sonnenberg M, Van Der Kuip H, Haubeiß S, Fritz P, Schroth W, Friedel G, Simon W, Mürdter TE, Aulitzky WE. 2008. Highly variable response to cytotoxic chemotherapy in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) from lung and breast. BMC Cancer 8:364-376

Speirs V, Green AR, Walton DS, Kerin MJ, Fox JN, Carleton PJ, Desai SB, Atkin SL. 1998. Short-term primary culture of epithelial cells derived from human breast tumours. British Journal of Cancer 78:1421-1429.

Stagos D, Amoutzias GD, Matakos A, Spyrou A, Tsatsakis AM, Kouretas D. 2012. Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. Food and Chemical Toxicology 50(6):2155-2170.

Stanojković TP, Konić-Ristić A, Juranić ZD, Savikin K, Zdunić G, Menković N, Jadranin M. 2010. Cytotoxic and cell cycle effects induced by two herbal extracts on human cervix carcinoma and human breast cancer cell lines. *Journal of Medicinal Food* 13(2):291-297.

Stoff-Khalili MA, Stoff A, Rivera AA, Banerjee NS, Everts M, Young S, Siegal GP, Richter DF, Wang M, Dall P, Mathis JM, Zhu ZB, Curiel DT. 2005. Preclinical evaluation of transcriptional targeting strategies for carcinoma of the breast in a tissue slice model system. *Breast Cancer Res* 7(6):R1141-1152.

Tulpule K, Hohnholt MC, Hirrlinger J, Dringen R. 2014. Primary cultures of astrocytes and neurons as model systems to study the metabolism and metabolite export from brain cells. In: *Brain Energy Metabolism*, Hirrlinger J and Waagepetersen WS (eds). Springer: New York, vol. 90, pp. 45-72.

Van der Kuip H, Mürdter TE, Sonnenberg M, McClellan M, Gutzeit S, Gerteis A, Simon W, Fritz P, Aulitzky WE. 2006. Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer* 6:86-96.

Van Geer MA, Kuhlmann KF, Bakker CT, Ten Kate FJ, Oude Elferink RP, Bosma PJ. 2009. *Ex-vivo* evaluation of gene therapy vectors in human pancreatic (cancer) tissue slices. *World Journal of Gastroenterology* 15(11):1359-1366.

Venkatachalam K, Gunasekaran S, Santiago-Jesudoss VA, Namasivayam N. 2012. The effect of rosmarinic acid on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Experimental and Toxicologic Pathology* 65(4):409-418.

Vera-Ramirez L, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa CL, Quiles JL, Ramirez-Tortosa M, Lorente JA. 2013. Transcriptional shift identifies a set of genes driving breast cancer chemoresistance. *PLoS One* 8(1):e53983.

Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. 1993. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 71(12):3926-3931.

Viveros-Valdez E, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Castro-Garza J, Carranza-Rosales P. 2010. Antiproliferative effect from the Mexican poleo (*Hedeoma drummondii*). *Journal of Medicinal Food* 13(3):740-742.

Wang H, Khor TO, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Lee JH, Kong AN. 2012. Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 12(10):1281-1305.

Wang Y, Rougely L, You M, Lubet R. 2012. Animal models of lung cancer characterization and use for chemoprevention research. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 105:211-226.

Weiland T, Klein K, Zimmermann M, Speicher T, Venturelli S, Berger A, Bantel H, Königsrainer A, Schenk M, Weiss TS, Wendel A, Schwab M, Bitzer M, Lauer UM. 2012. Selective protection of human liver tissue in TNF-targeting of cancers of the liver by transient depletion of adenosine triphosphate. *PLoS One* 7(12):e52496.

W.H.O. 2012. Cáncer. Nota descriptiva N°297. *World Health Organization* [Online]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 131(1):18-43.

Woodward WA, Strom EA, Tucker SL, McNeese MD, Perkins GH, Schechter NR, Singletary SE, Theriault RL, Hortobagyi GN, Hunt KK, Buchholz TA. 2003. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *Journal of Clinical Oncology* 21(17):3244-3248.

Xu Y, Jiang Z, Ji G, Liu J. 2010. Inhibition of bone metastasis from breast carcinoma by rosmarinic acid. *Planta Medica* 76(10):956-62.

Yang CS, Maliakal P, Meng X. 2002. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 42:25-54.

Yang XW, Wang XL, Cao LQ, Jiang XF, Peng HP, Lin SM, Xue P, Chen D. 2012. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate enhances 5-fluorouracil-induced cell growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology Research* 42(5):494-501.

Yeh C-T, Wu C-H, Yen G-C. 2010. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells by modulating c-Jun N-terminal kinase, Akt and mammalian target of rapamycin signaling. *Molecular Nutrition and Food Research* 54:1-11.

Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. 2010. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The Lancet Oncology* 11(2):174-183.

Zimmermann M, Armeanu S, Smirnow I, Kupka S, Wagner S, Wehrmann M, Rots MG, Groothuis GMM, Weiss TS, Königsrainer A, Gregor M, Bitzer M, Lauer UM. 2009. Human precision-cut liver tumor slices as a tumor patient-individual predictive test system for oncolytic measles vaccine viruses. *International Journal of Oncology* 34:1247-1256.

12. APÉNDICES

12.1 RESUMEN BIOGRÁFICO

Irma Edith Carranza Torres

Candidata para el grado de

Doctora en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: REBANADAS DE TUMOR MAMARIO COMO SISTEMA MULTICELULAR
PARA LA BÚSQUEDA DE COMPUESTOS CON POTENCIAL
ANTINEOPLÁSICO

Campo de estudio: Ciencias de la Vida

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 13 de Julio de 1982, hija de
David Carranza Gutiérrez e Irma Torres Canizales

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma
de Nuevo León, grado obtenido Químico Parasitólogo en 2004, primer lugar en la
generación. En 2010 obtuvo el grado de Maestra en Ciencias con acentuación en
Microbiología en la misma Universidad institución.

Experiencia Profesional: Analista de Calidad en Embotelladoras Arca S.A. de 2004-
2005; Becaria de Investigación en el CIBIN-IMSS de 2008-2009; Profesional no
docente de la Universidad Autónoma de Nuevo León de 2010 a 2012.

12.2 ARTÍCULO I.SI

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2015, Article ID 618021, 13 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/618021>



Research Article

Organotypic Culture of Breast Tumor Explants as a Multicellular System for the Screening of Natural Compounds with Antineoplastic Potential

Irma Edith Carranza-Torres,^{1,2} Nancy Elena Guzmán-Delgado,³
Consuelo Coronado-Martínez,¹ José Inocente Bañuelos-García,⁴ Ezequiel Viveros-Valdez,²
Javier Morán-Martínez,⁵ and Pilar Carranza-Rosales¹

¹Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, 64720 Monterrey, NL, Mexico

²Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, 64460 San Nicolás de los Garza, NL, Mexico

³Unidad Médica de Alta Especialidad No. 34, Instituto Mexicano del Seguro Social, 64730 Monterrey, NL, Mexico

⁴Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23, Instituto Mexicano del Seguro Social, 64010 Monterrey, NL, Mexico

⁵Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila, 66451 Torreón, COAH, Mexico

Correspondence should be addressed to Pilar Carranza-Rosales; pilarcarranza@cibinmty.net

Received 4 November 2014; Revised 23 February 2015; Accepted 2 March 2015

Academic Editor: Zeki Topcu

Copyright © 2015 Irma Edith Carranza-Torres et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Breast cancer is the leading cause of death in women worldwide. The search for novel compounds with antitumor activity, with less adverse effects and higher efficacy, and the development of methods to evaluate their toxicity is an area of intense research. In this study we implemented the preparation and culture of breast tumor explants, which were obtained from precision-cut breast tumor slices. In order to validate the model we are proposing to screen antineoplastic effect of natural compounds, we selected caffeic acid, ursolic acid, and rosmarinic acid. Using the Krumdieck tissue slicer, precision-cut tissue slices were prepared from breast cancer samples; from these slices, 4 mm explants were obtained and incubated with the selected compounds. Viability was assessed by Alamar Blue assay, LDH release, and histopathological criteria. Results showed that the viability of the explants cultured in the presence of paclitaxel (positive control) decreased significantly ($P < 0.05$); however, tumor samples responded differently to each compound. When the explants were cocultured with paclitaxel and compounds, a synergic effect was observed. This study shows that *ex vivo* culture of breast cancer explants offers a suitable alternative model for evaluating natural or synthetic compounds with antitumor properties within the complex microenvironment of the tumor.

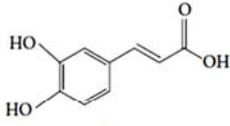
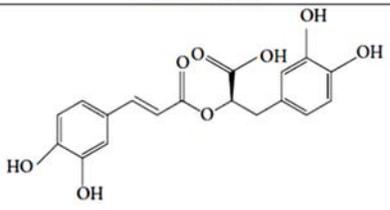
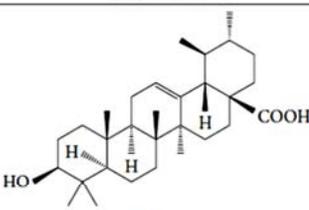
1. Introduction

Cancer is the leading cause of mortality worldwide, with 8.2 million deaths and 14.1 million new cases recorded during 2012 alone. According to the World Health Organization, the number of deaths will continue to rise across the globe, with the alarming prediction of 19.3 million new cases by 2025. Breast cancer is the most frequent cancer found in women; it possesses the most elevated morbidity and mortality. In 2012, approximately 1.7 million women were diagnosed with breast cancer in the world, and 522,000 died as a direct result of this disease [1].

Conventional cancer therapies include surgery, radiation, and chemotherapy. Although the latter is widely used, in most cases it produces undesirable side effects. Chemoresistance and/or recurrence of cancer after chemotherapy are frequent events seen with treatment of this disease [2]. Thus, different research groups are now focused on finding novel drugs or anticancer compounds [3, 4] while others are developing methodologies for the evaluation of these drugs [5–7].

One of the current approaches for investigating novel antineoplastic or chemopreventive compounds is based on natural products research. This is because some of these compounds inhibit cell proliferation and promote apoptosis

TABLE 1: Bioactive compounds in commonly used herbs and spices.

Caffeic acid	Rosmarinic acid	Ursolic acid
		
Coffee, parsley Cardamom, rosemary Cumin, sage Fennel, tarragon Nutmeg, thyme Oregano	Rosemary Marjoram Oregano Basil Sage Thyme	Basil Marjoram Sage Thyme

in various types of tumor cells including breast cancer cells. Furthermore, it is well known that approximately 60% of the drugs administered in cancer treatment were isolated from natural products [8–10].

For the purpose of this study, we selected three naturally occurring compounds which possess antitumor and chemopreventive activities, namely, caffeic acid (CA), ursolic acid (UA), and rosmarinic acid (RA). These bioactive compounds are present in fruits, vegetables, medicinal plants, and culinary species. Table 1 shows their chemical structures and some examples of culinary herbs and spices where they are abundantly found [11–13]. CA is known to inhibit DNA methylation in human breast cancer cells and it has been suggested that it may reduce the risk of acquiring breast cancer [14]; however, epidemiological studies have been inconsistent and no established association between coffee intake and breast cancer development has been discovered [15]. We have previously reported that CA obtained from *Hedeoma drummondii* extracts possesses antiproliferative effect against MCF-7 and HeLa cells [16]. UA is known to inhibit proliferation of MCF-7 cells [17, 18], induce apoptosis, and inhibit oxygen consumption in various tumor cell lines [19, 20]. It suppresses the migration and invasion of MDA-MB-231 cells [21] and exerts antitumor effects on multidrug-resistant cancer cells [22]. RA has antioxidant, antitumor, antimutagenic, and chemopreventive activities [12, 23–25]. The effect of RA on cell proliferation and apoptosis induction has been determined in MCF-7, MDA-MB-361, MDA-MB-453, and HeLa cells [26, 27]; RA induces apoptosis and inhibits metastasis of MDA-MB-231BO cells. Hence, RA is also considered a good candidate for new therapeutic approaches in the treatment of breast cancer [28].

On the other hand, the antitumor activity and mechanisms involved in the inhibition of carcinogenesis by novel compounds with antineoplastic potential must be evaluated and validated using models that extrapolate their effects in humans. The results obtained from cells cultured *in vitro* and from experiments conducted on animals do not reflect what happens in humans, especially with regard to the full

physiology, metabolism, pharmacokinetics, and other factors of high complexity. Therefore, it is important to use experimental models for easy and proper observation of the effects of bioactive compounds in tumor samples where tumor microenvironment is preserved. Conde et al. suggest that to study behavior of tumors it is necessary to maintain or reconstitute a similar environment of the tumor *in situ* [29]. From the experimental point of view, a way to preserve tissue architecture with little or no manipulation is through the organotypic culture of intact and fresh tumor tissues. Tissue slices, one of the methods recently used, is an intermediate system between *in vivo* and *in vitro* models, which offers a new perspective to the results obtained with cell lines.

Tissue slices contain virtually all the cells from the tissue under study. They retain histological and three-dimensional structure (3D), with inter- and extracellular interactions, cell matrix components, and, most interestingly, metabolic capacity. Hence, cultured tissue slices are considered a suitable tool for the study of multicellular processes [30].

Precision-cut tissue slices have mainly been used to study metabolism and toxicity of xenobiotics [31, 32], biotransformation of drugs, gene expression studies, and morphological analysis, among other studies [33, 34]. Our group has recently described their application as an infection model for the parasitic protozoa *Entamoeba histolytica* [35, 36]. Other than normal tissue slices, tumor slices are 3D cultures in which it is possible to evaluate *ex vivo* therapeutic efficacy of oncolytic vectors [37–41] and drugs such as meloxicam and Taxol [42–44] or study the interactions between stromal components and epithelial cells with the extracellular environment, as well as the response to cytokines and drugs [45]. The taxoid paclitaxel (abbreviated TX in this work), known by its original brand name, Taxol, represents the most important first-line antineoplastic drug for treatment of various types of cancer, including breast cancer, ovarian cancer, non-small cell lung cancer, and AIDS related Kaposi's sarcoma, among others. TX was purified and identified as the active constituent from the bark of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*, in 1971 [46, 47]. Its mechanism of action relies on the promotion of microtubule

TABLE 2: Clinical and histopathological data of the subjects.

Patient	Age	Clinical stage	Histologic type	Tumor size	Estrogen receptor (ER)	Progesterone receptor (PR)	Her2 status	Molecular classification
A	50 yr	T2N1M0 (grading: IIB)	Ductal infiltrating	3 cm	(-)	(-)	(+)	Her2+
B	59 yr	T3N0M0 (grading: IIB)	Ductal infiltrating	5 cm	(+)	(+)	(+)	Luminal B
C	41 yr	T2N1M0 (grading: IIB)	Ductal infiltrating	4 cm	(+)	(+)	(-)	Luminal A

assembly and inhibition of microtubule disassembly; cells exposed to paclitaxel cannot form a mitotic spindle; this interferes with cell division and induces cell death [48].

Using *ex vivo* organotypic cultures of breast cancer explants treated with CA, UA, RA, and TX, we found that this model is an alternative system for studying anticancer activity or synergistic potential assessing natural products. Cultured explants retain their typical morphology and viability for at least 3 days. With this method, a sufficient number of slices and explants can be obtained from minimal amounts of tissue, enabling the study of several compounds within a single tumor specimen.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals. Caffeic acid, ursolic acid, rosmarinic acid, paclitaxel, and insulin-transferrin-selenium were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). DMEM/F12 medium, fetal bovine serum, gentamicin, penicillin-streptomycin, and Alamar Blue were obtained from Invitrogen (Grand Island, NY, USA). The antibody against Ki 67 was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The reagents for general use were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Tumor Samples. Infiltrating ductal adenocarcinoma specimens were collected from 11 patients during surgery at the Hospital of Gynecology and Obstetrics (UMAE # 23) from the Mexican Institute of Social Security (IMSS). The pathologist dissected the specimen immediately after surgery to confirm its tumorous nature and to avoid contamination. Informed consent was obtained from all patients. Tissues were collected in cold serum-free DMEM/F12 medium (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) and transported at 4°C to the organotypic culture laboratory for immediate processing. Approval was obtained from the Institutional Review Board (Mexican Institute of Social Security) before initiation of studies on human tissue. The clinical and histopathological data of these patients are described in Table 2.

2.3. Preparation of Slices and Explants from Breast Tumor. From representative tumor samples, cylindrical tissue cores of 10 mm diameter were obtained; from these, tissue slices of 250–300 µm thickness were prepared using the Krumdieck tissue slicer (Alabama Research & Development, Munford, AL, USA), with constant flow of Krebs Henseleit bicarbonate buffer (KB) at 4°C which was gassed with carbogen. The slices were collected in KB buffer at 4°C. To optimize the tumor sample and homogenize the size of tissues, small tumor

explants, 4 mm in diameter and 250–300 µm in thickness, were prepared using a biopsy punch from the first-obtained slices. Tumor explants were placed in six-well microplates containing DMEM/F12 culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 5 µg/mL bovine insulin, 100 µg/mL gentamicin, insulin-transferrin-selenium, and 25 mM glucose (DMEM/F12 supplemented medium). Plates were preincubated for 1 h at 37°C, 5% CO₂/95% air, and agitation at 25 rpm. The interval between resection of the tumor and the incubation of the explants was no more than 2 h. The entire process was performed under aseptic conditions.

2.4. Viability of Tumor Explants. In order to confirm that the tumor samples were still viable during the entire experiments, the viability of the tumor explants was determined at different times before testing the antineoplastic effect of CA, UA, and RA. To test this, explants with 4 mm diameter/250–300 µm thickness were placed in 24-well microplates containing 1 mL of DMEM/F12 supplemented medium and incubated for 4 days at 37°C, 5% CO₂/95% air, and constant agitation of 25 rpm. Viability was determined every 24 h in a group of four explants. Protocols for metabolic viability (AB), cytotoxicity (LDH release), cellular proliferation (Ki 67 expression), and morphological integrity (histopathological analysis) are described in the corresponding section. The culture medium was changed every 24 h through 96 h, and each time viability, proliferation, and morphology were assessed.

2.5. Treatment of Tumor Explants with TX and Bioactive Compounds. After 1 h of preincubation, the tumor explants were transferred to 24-well microplates containing 1 mL of DMEM/F12 supplemented medium. Afterwards, the following compounds were added: 20 µg/mL TX (positive control), 11–33 µg/mL CA, 20–60 µg/mL for RA and UA, and combinations of these compounds with TX. These concentrations were selected on the basis of IC₅₀ values reported in cell lines [16, 20, 49]. Control group (100% viability) consisted of untreated explants, which were incubated only with culture medium. Afterwards, the microplate with the explants and their corresponding treatments were incubated for 48 h at 37°C, 5% CO₂/95% air, and constant agitation at 25 rpm.

2.6. Alamar Blue Viability Assay. The effect of treatment with CA, UA, and RA on the viability of the tumor explants was assessed by the Alamar Blue assay. Alamar Blue (AB) is a blue nonfluorescent dye reduced to a pink-colored, highly fluorescent resorufin by metabolically active cells. It is known that viable cells reduce the microenvironment to a pink color, while dead or inactive cells do not change

the original blue color of resazurin, the active ingredient of AB. After 48 h of incubation with compounds, as well as with cell culture medium and TX (controls), the explants were incubated for additional 4 h with 10% Alamar Blue in 500 μ L DMEM/F12 supplemented medium at 37°C in the conditions described earlier. Afterwards, 100 μ L was collected from each sample and transferred to a 96-well microplate. Fluorescence values were read using a multi-plate reader (Synergy BioTek HT) at 530 nm excitation/590 nm emission wavelengths. The percentage of viability relative to control was calculated using the free software AbD Serotec fluorometric calculator for AB assays (<http://www.abdserotec.com/colorimetric-calculator-fluorometric-alamarblue.html>).

2.7. Lactate Dehydrogenase Assessment. Another way to assess the viability of the explants treated with the compounds and that of the untreated controls was by assessment of the leakage of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) into the supernatant of the culture medium [50]. The assay is based on the release of the cytosolic enzyme LDH into the media by cells with damaged plasma membranes [51]. The cytotoxicity induced by CA, UA, and RA on the tumor explants can be quantitatively determined by measuring the activity of this enzyme. The total amount of released enzyme was determined using an Architect C400 clinical chemical analyzer (Abbott).

2.8. Histopathological Analysis. After each experimental time point, the explants were fixed in 10% neutral formalin and then embedded in paraffin using the conventional histological technique. Tissue sections of 4 μ m were prepared on a microtome and mounted on glass slides. Afterwards, the slides were deparaffinized and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Then permanent sections were prepared with coverslips and synthetic resin. The stained preparations were observed by a pathologist using a Zeiss Axiostar Plus Brightfield microscope. Morphological parameters analyzed in treated and control explants included necrosis, viable/damaged tumor cells, and inflammation. Representative photographs of all treatments were obtained with a 5.0 MP Moticam camera.

2.9. Immunohistochemistry for Ki 67 Expression. Analysis of Ki 67 expression was performed on paraffin sections using the Dako LSAB System-HRP methodology to assess the rate of cell proliferation from treated and untreated tumor explants. The procedure was performed according to the recommendations of the manufacturer. The expression of this marker is nuclear, and the proliferation index was defined as follows: low: expression in $\leq 10\%$ of cells; intermediate: expression in 10–20% of cells; and high: expression in $\geq 20\%$ of cells [52].

2.10. Statistical Analysis. Statistical analysis was performed with SPSS version 22.0 software. Quantitative data were expressed as mean and standard deviation. Differences in continuous variables with normal distribution were analyzed

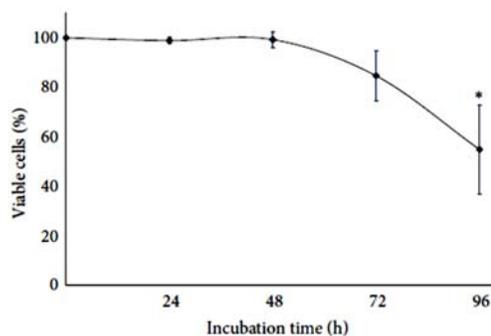


FIGURE 1: Viability of cultures breast cancer explants. To determine the optimal time for performing the experiments with bioactive compounds, explants were cultivated in DMEM/F12 supplemented medium for 24, 48, 72, and 96 h. The viability was assessed by the Alamar Blue assay. Values reflect means \pm SD. Asterisks (*) indicate significant statistical differences ($P < 0.05$).

with Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U* test for nonnormal distributions.

3. Results

3.1. Characteristics of Patient Samples Used for the Preparation and Culture of Breast Cancer Tissue Explants. Eleven samples of human breast cancer with histopathological diagnosis of infiltrating ductal adenocarcinoma with nonspecific pattern were collected fresh from the operating room. Three samples were used to standardize and optimize the preparation of precision-cut breast tumor slices, and, from these, explants of a defined size and thickness (4 mm in diameter and 250–300 μ m thick) were obtained for *ex vivo* culture under controlled conditions. Three more samples were used to standardize the concentrations to test each of the bioactive compounds and TX. Three other samples were included in three independent assays to assess the effect of CA, UA, RA, and TX on the viability of tumor tissue explants. The last two samples were discarded due to abundant necrosis, as well as elevated adipose and fibrous tissues, which prevented proper processing.

3.2. Viability of Tumor Explants

3.2.1. Metabolic Activity: Alamar Blue Assay. Tumor explants cultured for 24 and 48 h remained viable throughout the incubation period, with mean viability of 99% compared to basal value (100%). At 72 h, a slight decrease was observed in viability (84.7% \pm 10.2), whereas, at 96 h, the percentage decreased to 55.1% \pm 17.9 ($P < 0.05$). These results showed the metabolism of explants of breast tumors, and hence, their viability remained intact during at least the first 48 h of culture. With these results, we decided that 48 h was the optimal time to perform cytotoxicity assays with the bioactive compounds (Figure 1).

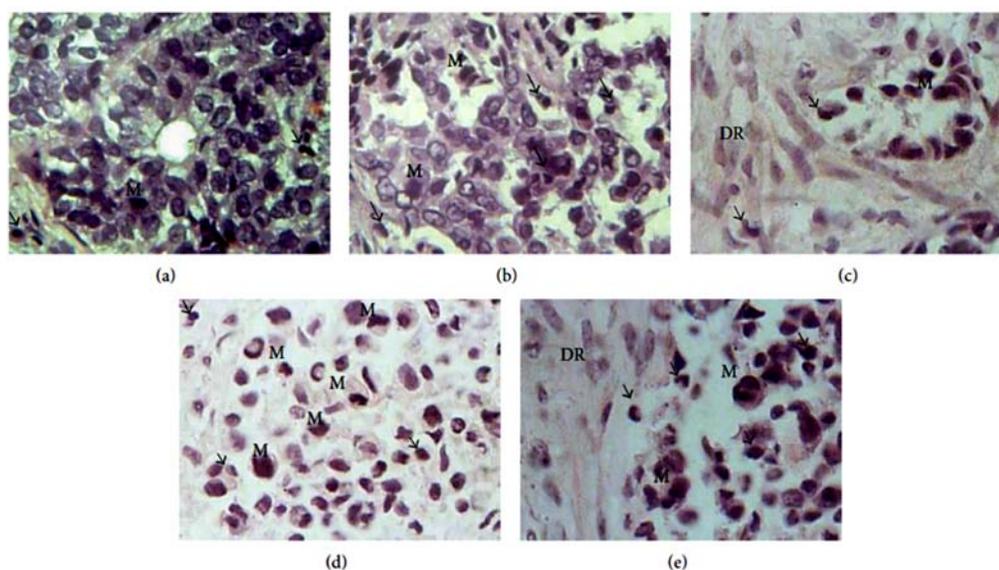


FIGURE 2: Morphological integrity of tumor tissue explants cultured *ex vivo*. Histopathological findings of tumor tissue at zero time (basal) and cultivated during different times in DMEM/F12 supplemented medium show that neoplastic tissue remains viable. It is possible to observe cells in active mitosis (M), desmoplastic reaction (DR) adjacent to the tumor cells, and presence of inflammatory cells (arrow). Desmoplasia or desmoplastic reaction is usually only associated with malignant neoplasms, which can evoke a fibrosis response by invading healthy tissue. All these characteristics are typical of tumor tissue. (a) 0 h, (b) 24 h, (c) 48 h, (d) 72 h, and (e) 96 h in culture, respectively. H&E staining (40x).

3.2.2. Morphological Integrity: Histopathological Analysis. After 96 h in culture, it was found that the typical histology of the tumor tissue was preserved in breast tumor explants. As shown in Figure 2, in the explants cultured for 24, 48, 72, and 96 h, neoplastic cells retained their characteristic morphology and mitotic activity. It was possible to identify microcalcifications, fibrous connective tissue, desmoplastic stromal reaction, inflammatory cells, and adipose tissue; furthermore, mitotic cells were observed at all-time points. These results (as shown in Figure 3) confirm that breast cancer explants remained viable and actively proliferating for up to 96 h.

3.2.3. Proliferative Activity: Immunohistochemical Expression of Ki 67. Compared to normal breast and tumor tissues (negative and positive controls, resp.), the proliferation index of the cultivated explants was greater than 50% during all the incubation times (24–72 h). This result corresponds to a high proliferation index according to the criteria defined in Materials and Methods and suggests that the tissue remains viable and actively proliferating during *ex vivo* culture conditions (Figure 3).

3.2.4. Effects of Bioactive Compounds and TX on Breast Tumor Explants. In order to ascertain that the breast tumor explants responded to the *ex vivo* treatment with CA, UA, and RA, we decided to first evaluate the metabolic activity of these explants after 48 h of incubation with varying doses of TX (5, 10, 15, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As expected, a dose-response curve of cytotoxicity, directly proportional to the concentration of TX,

was observed. Since 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of TX reduced tumor viability to less than 50% ($P < 0.05$), we selected this concentration for assays in which TX was a reference for antineoplastic activity (Figure 4). In the case of the effect of the bioactive compounds on the viability of breast tumor explants, the initial concentrations tested for CA, UA, and RA were 11–33, 20–60, and 20–60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. These concentrations were not cytotoxic since the explants remained viable and also conserved their intact histological structure (data not shown). Because of this, it was necessary to increase the experimental concentrations of CA and UA to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and of RA to 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

When the histological structure of uncultured tumor explants was compared with explants cultivated for 48 h without any treatment, poorly differentiated neoplastic with nonspecific pattern neoplastic cells, which retained their viability, were observed. However, when the explants were cultured in the presence of only TX and with combinations of TX plus bioactive compounds, scattered necrotic areas as well as a remarkable reduction (more than 40%) in the population of neoplastic cells were also observed (Figure 5). These results suggest a potential antineoplastic effect of the bioactive compounds, reinforced when they are combined with TX. Additionally, by analyzing the metabolic activity of the explants incubated with these new concentrations, it was observed, as expected, that individual samples from each patient responded differently to the tested compounds. CA was the most effective in patient A, reducing tumor viability to 67.2%, while the combination of TX + CA decreased

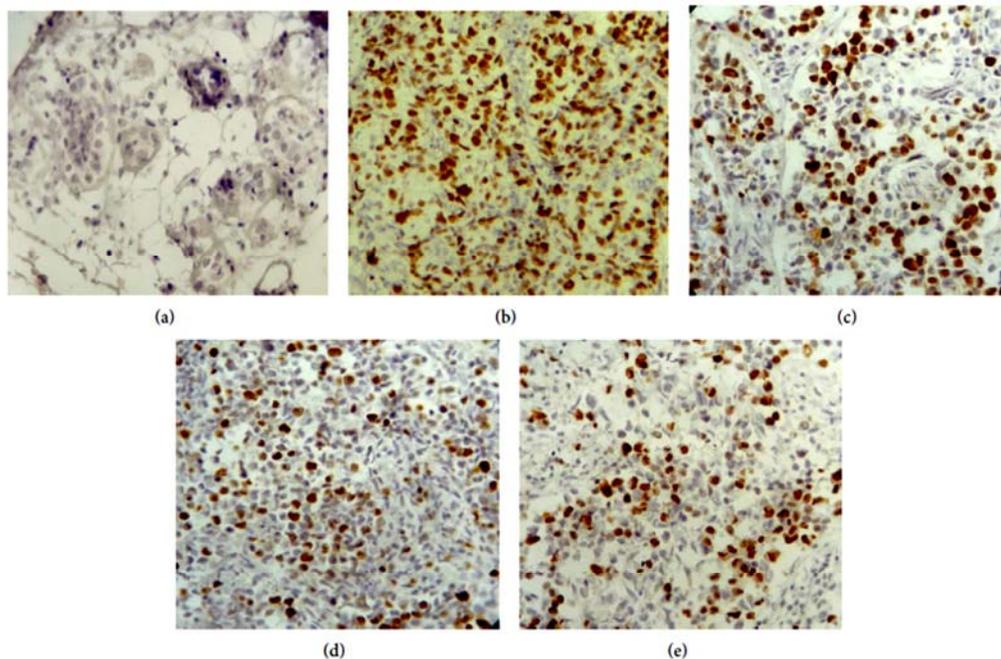


FIGURE 3: Nuclear expression of the cell proliferation marker Ki 67 in cultures of breast cancer explants. Representative images showing that over 40% of the neoplastic cells express Ki 67 at all-time points. The proliferation index is considered "high" when >20% of the cells are positive for this marker. (a) Normal breast tissue (negative control); (b) breast tumor (positive control); (c), (d), and (e) breast tumor explants cultured for 24, 48, and 72 h, respectively. Immunohistochemical staining (10x).

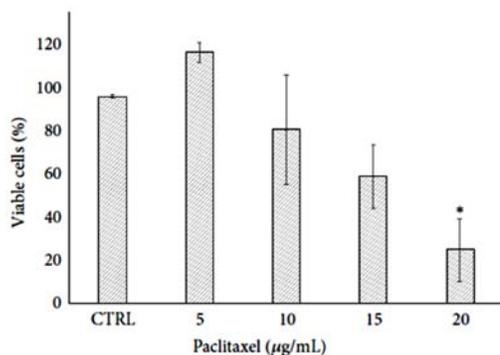


FIGURE 4: Effect of paclitaxel on the viability of tumor explants. Breast tumor explants were cultured during 48 h in the presence of different concentrations of paclitaxel. The viability was assessed at the indicated times using the Alamar Blue assay. Values reflect means \pm SD. Asterisks (*) indicate significant statistical differences ($P < 0.05$).

viability to 17.1%. Likewise, CA was the most active compound against the tumor of patient B, in which viability was reduced by 32.5; also, combination with TX had an important effect on viability, with a reduction of 20.2%. In contrast, none of the compounds had a cytotoxic effect against the patient

C sample; however, a marked reduction in viability was observed when individual compounds combined with TX were tested. Interestingly, all of the compounds exerted a synergistic effect, enhancing the tissue toxicity of TX in all three tumor samples (Figure 6).

The cytotoxicity of TX alone and combinations with bioactive compounds was assessed via the release of the cytosolic enzyme LDH into the supernatants from the culture media in which tumor explants were cultivated. As shown by the data, the combination of TX + CA induced 1.42- and 1.80-fold increase of LDH release in the tumor explants from patients A and B, respectively, compared to untreated control. For patient C, the combination of TX with RA induced a 2.34-fold increase (Figure 7). These values were statistically significant ($P < 0.05$).

4. Discussion

The aim of this study was to demonstrate the use of *ex vivo* organotypic culture of human breast tumor explants as an alternative model system for evaluating natural compounds with antineoplastic potential. The most important characteristic of these explants is that they are obtained from precision-cut breast tissue slices which possess a defined size and thickness.

This is an interesting model which allows the study of different aspects of cancer. It has all the advantages of normal

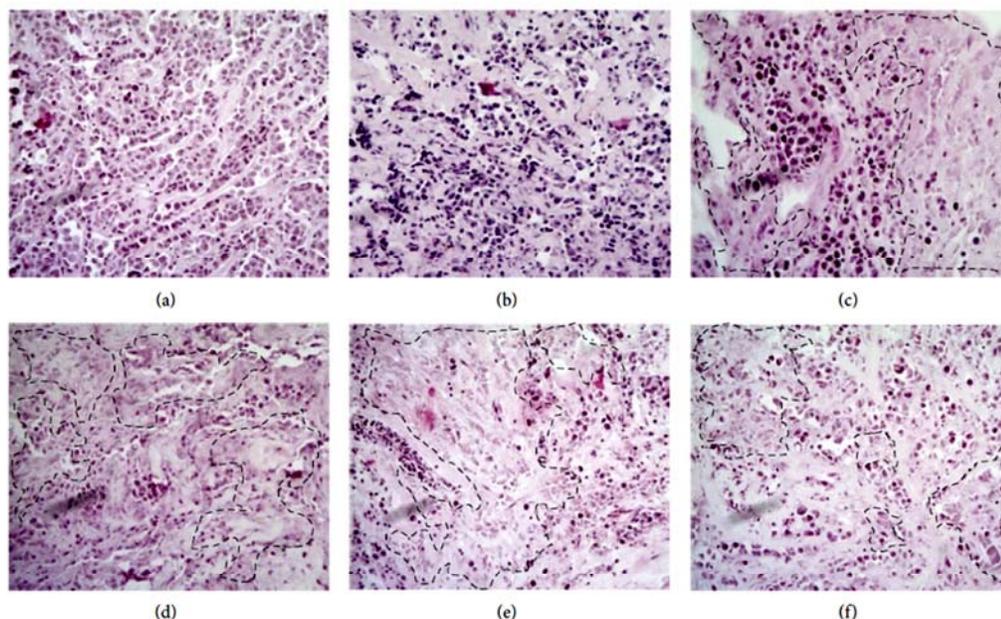


FIGURE 5: Effect of the bioactive compounds and their combination with paclitaxel on cultures of breast cancer explants. Explants from control at zero h (a) and control without any treatment cultured for 48 h (b) show poorly differentiated invasive neoplasm and no evidence of tumor necrosis areas. In contrast, in explants incubated with TX (c) and their combinations with CA (d), RA (e), and UA (f), an evident pathological response was observed, which is mainly reflected as a notable diminution of the neoplastic cells (40–80%) which can be appreciated as extensive areas of necrosis induced by treatments (dotted lines) H&E staining (10x).

tissues slices and also contributes to the significant decrease in the number of animals used in experimentation [30, 35]. Also, it enables the optimization of the amount of available tissue and favors the realization of a large number of assays that capture many aspects of tumor heterogeneity and complexity [53]. One of the difficulties we faced during the preparation of breast tumor slices was the viscosity or the very soft consistency of some tumors; thus, based on this fact, 2 of the 11 samples were discarded. This disadvantage correlated with those reported by other investigators [54, 55].

To be certain that this system is reliable and adequate to assess the effect of these bioactive compounds, the most critical step was to maintain the viability of the explants during *ex vivo* culture conditions and during subsequent treatment with these compounds. To monitor viability, we used the AB assay because it is a simple and affordable method that allows assessing cell viability by adding AB reagent directly to the culture medium. The active compound of AB is resazurin, which is reduced to resorufin through mitochondrial metabolism in living cells. Moreover the AB assay does not require additional steps as do other viability tests, in which it is necessary to lyse or damage cell membranes in order to release the reduced metabolite [56, 57]. This assay gives reliable measurements of the number of metabolically active cells and is one of the most commonly used methods for assessing cell proliferation. Other advantages include its homogeneous nature, the stability of generated

signal, high sensitivity, compatibility with absorbance or fluorescence instruments and different biological models, and also safety for the user and the environment [58, 59]. The results from histopathological and AB analysis demonstrate that both metabolic activity and morphological integrity were conserved for at least 72 h (Figures 1 and 2).

On the other hand, immunohistochemical analysis of Ki 67 showed that cellular proliferation remained stable over the experimental period. Ki 67 is a proliferation marker strongly associated with cells undergoing mitosis in the cellular cycle [60]. Proliferation index in cancer cells from cultivated explants was >40% in all-time points, which is considered “high” according to accepted criteria (Figure 3) [52] and is similar to the reports from other authors, who conducted tests of selective toxicity in breast cancer tissue and were able to maintain viability and proliferation for 24 h [61] and 96 h [44, 62] or up to 7 days [55].

In order to validate the usefulness of the model, we incubated the breast tumor explants with different concentrations of TX, a well-known antineoplastic drug. As was expected, a dose-response curve was observed (Figure 4). With results from three different tumor samples, we used 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as a positive control in the following studies. Afterwards, three independent experiments were carried out to test the effect of CA, UA, and RA, which are naturally occurring products whose anticancer and chemopreventive properties have been reported previously [10, 12, 14, 21, 22, 63, 64].

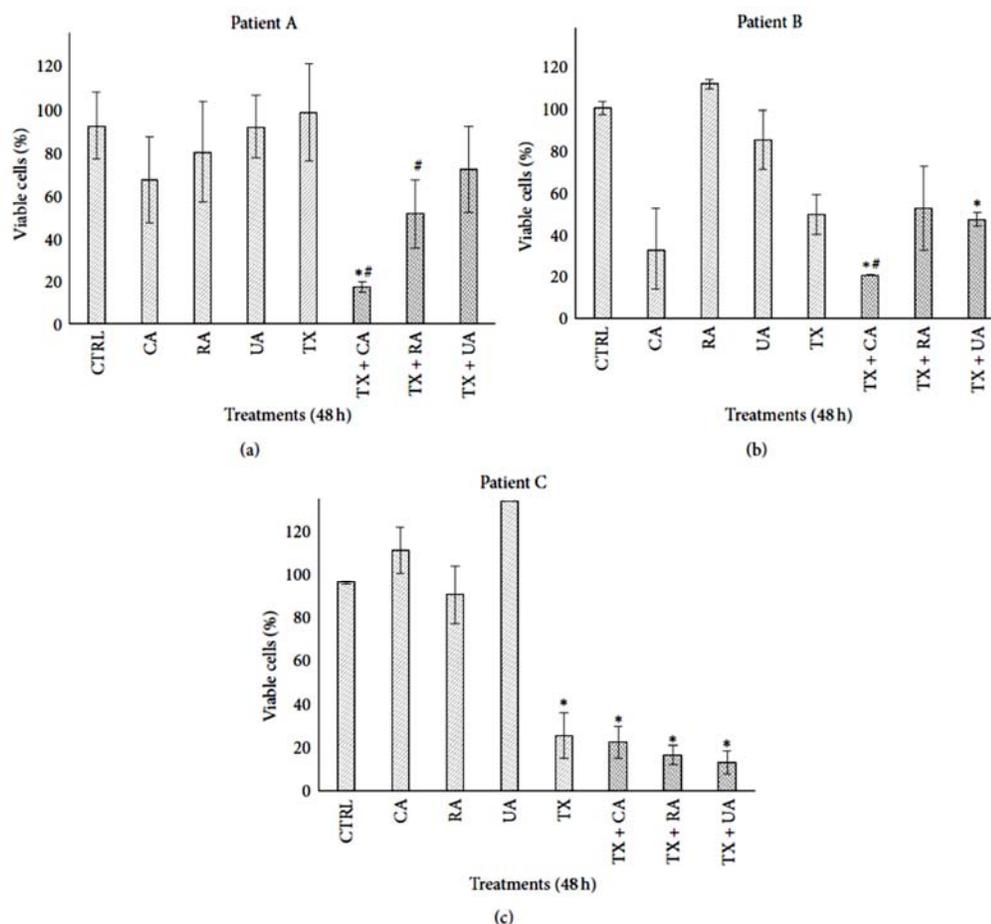


FIGURE 6: Effect of different treatments on the viability of breast cancer explants. Tumor explants were incubated with the bioactive compounds for 48 h and then cell viability was determined using the Alamar Blue assay. Control explants did not receive any treatment. Concentrations of compounds were 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CA and UA, 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RA, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TX. The same concentrations were used in the combinations. Results were compared to the untreated control. Values reflect means \pm SD. Asterisks (*) indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) compared to control. Pound key (#) indicates significant statistical differences ($P < 0.05$) compared to paclitaxel.

The concentrations used first were selected on the basis of IC_{50} values reported in cell lines [16, 20, 49]; however, we did not observe a cytotoxic effect on the tumor tissue explants. This can be attributed to the differences between *in vitro* cell cultures and tissue explants, because in tissue explants there is more than one cell lineage interacting with each other and with extracellular matrix components. It is well known that the extracellular matrix and the tumor microenvironment protect neoplastic cells from cytotoxic agents [65]. When we increased the concentrations of the bioactive compounds to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for CA and UA and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for RA, we found that CA had the greatest effect, decreasing in tumor viability (Figure 6). The concentration used for CA, as well as the results observed, was similar to those described by

Chang et al., who reported that CA induced apoptosis and decreased viability in gastric cancer cells [66].

With regard to the synergistic effect between the bioactive compounds and TX, there are several reports using cell lines which combine antineoplastic agents with extracts from phenolic compounds, such as UA and RA, which enhance treatments effectiveness. These results suggest a great potential for the use of natural compounds, when added to TX or another antineoplastic agent, in order to reduce the dosage, and the side effects associated with chemotherapy, without sacrificing therapeutic results [67–70].

In addition to the aforementioned, performing such studies in organotypic *ex vivo* models, such as the one used in this work, which more closely resemble an *in vivo*

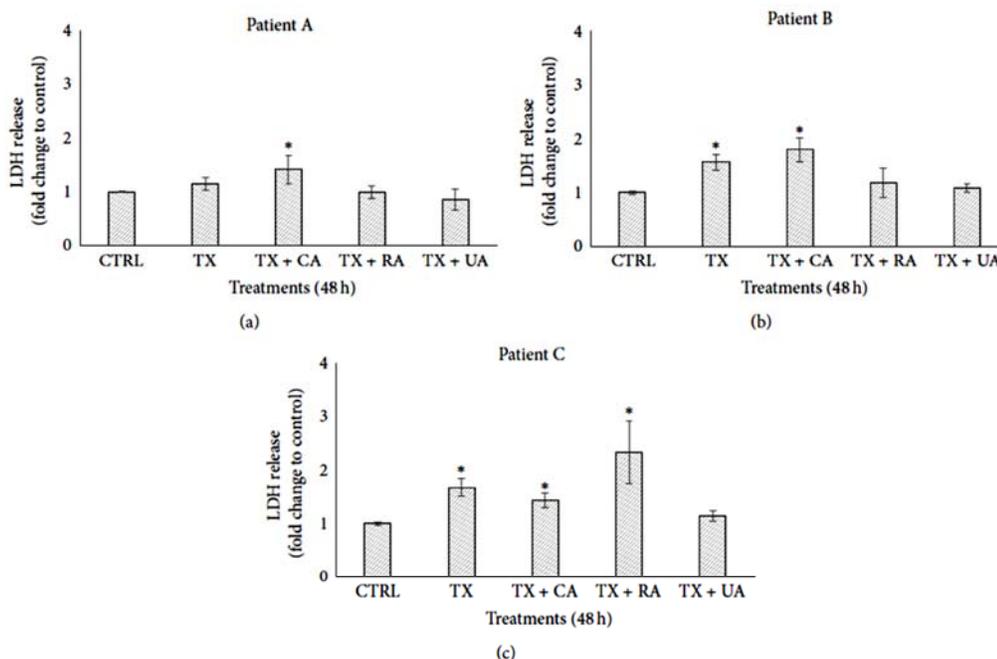


FIGURE 7: Effect of the combinations of paclitaxel with bioactive compounds on LDH release. Four tumor explants per treatment were incubated with combinations of TX and compounds for 48 h and then LDH activity was quantified by measuring the units of enzyme released into the supernatants from the culture medium. Control explants received no treatment. Concentrations in the combinations were 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (TX + CA and TX + UA) and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (TX + RA). Results of LDH release are expressed as fold of change relative to control. Values represent means \pm SD. Asterisks (*) indicate significant statistical differences ($P < 0.05$).

scenario, might be more useful for extrapolating results in humans. An important factor to be considered is the administration time of the bioactive compound to the tissue, which can be done before, during, or after incubation with the antineoplastic agent. In our case, we coincubated tumor explants in the presence of compounds plus TX based on the experimental points we previously defined; however, new assays can be designed by pretreating or posttreating tissues with different compounds and antineoplastic agents. When combinations of CA, UA, or RA plus TX were studied, CA acted synergistically with this antineoplastic drug since viability was lower than with TX alone (Figure 6). This result is different from those reported by Lin et al., who found that CA at 100–150 μM induced a slight increase in the proliferation of A549 and H1299 lung cancer cells and that pretreatment of cells with CA protects these cells from growth inhibition when they are incubated with TX [71]. This discrepancy in the results can be attributed to the difference in biological models (cell lines *versus* tumor explants), the pretreatment used, and also the fact that the CA concentrations were different. Furthermore, RA induced more pronounced membrane damage when coadministered with TX in the sample from patient C (Figure 7). Although the synergism between CA and TX was the strongest, a synergistic response

in reducing tumor viability for all compounds compared to compounds alone was observed (Figure 6).

The relationship between viability and cytotoxicity data is discrete since, although it is possible to observe that at lower percentage of viability LDH release increases, the values of LDH are relatively low considering that viability decreased at an average of 18% in the synergies between TX + CA in patients A and B and TX + RA in patient C; therefore one would expect LDH levels to be more elevated. One possible explanation for this fact is that inactivation of the enzyme could have occurred in the culture medium, as has been reported by Lash and Zalups, Kendig and Tarloff, Hohnholt et al., and Tulpule et al. [72–75]. Another possibility is that some natural compounds that have antioxidant effects protect cells and prevent the release of LDH. For example, da Silva Morrone et al. found that extracts of *Passiflora manicata* leaves protect from damage induced by reactive oxygen species, and the release of LDH was significantly reduced in precision-cut rat liver slices [76]. On the other hand, Liu et al. found that lipopolysaccharides obtained from *Lycium barbarum* inhibited the elevation of liver enzymes, among them, LDH in slices of liver exposed to carbon tetrachloride [77]. We believe that these last two reports may better explain our findings because these authors also

used tissue slices, while, in the reports mentioned above, cell cultures were used. On the other hand, as was described in the introduction, the bioactive compounds we used have antioxidant properties. These findings suggest that inactivation or inhibition of LDH may be more common than previously thought, and investigators should be aware of this at the moment of selecting LDH release as an endpoint for evaluating cytotoxicity.

Taken together, variability in the obtained results is possibly due to the fact that each patient's tumor behaves differently to anticancer drugs, which in turn is due in part to the extensive intratumoral heterogeneity present in each individual tumor [43, 78]. With regard to the last statement, since the 1950s, differential responses to the same drugs in patients with the same histological type of cancer have been reported, including adverse side effects [79]. These differences have been studied in the following years and today it is an accepted fact that individual response to drugs (resistance or sensitivity) depends, among other factors, on the mechanisms of disease (pharmacodynamics), the handling of the drug by patients (pharmacokinetics), the intratumoral heterogeneity, and complex signaling pathways, many of which are still unknown [78, 80, 81]. All these variations are reflected in the intratumoral heterogeneity because of factors that cause genomic instability [29, 78]. Intratumoral heterogeneity and the tumor microenvironment are conserved in the *ex vivo* model we are proposing, and it is possibly one of the reasons why the response to bioactive compounds is different in samples from patients, even when they had breast cancer at the same clinical stage, the same histological type, but different molecular classification.

5. Conclusions

In conclusion, our results show that organotypic cultures of breast cancer explants offer an alternative model for the *ex vivo* evaluation of novel compounds with potential anticancer properties, assessing the synergic effect with known anticancer compounds. This model opens perspectives to study biological effects of conventional and innovative treatment strategies in breast cancer research and to analyze different mechanisms of carcinogenesis in other human tumors.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

This work was partially supported by a grant from the Fondo de Investigación en Salud (CIS/IMSS) FIS/IMSS/PROT/G1145. Irma Edith Carranza-Torres received a Fellowship for Ph.D. studies from CONACYT (no. 338954).

References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik et al., *GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012*:

IARC Cancer Base No.11, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2013, <http://globocan.iarc.fr>.

- [2] L. Vera-Ramirez, P. Sanchez-Rovira, C. L. Ramirez-Tortosa, J. L. Quiles, M. Ramirez-Tortosa, and J. A. Lorente, "Transcriptional shift identifies a set of genes driving breast cancer chemoresistance," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e53983, 2013.
- [3] C. Morrissey, B. Gallis, J. W. Solazzi et al., "Effect of artemisinin derivatives on apoptosis and cell cycle in prostate cancer cells," *Anti-Cancer Drugs*, vol. 21, no. 4, pp. 423–432, 2010.
- [4] G.-J. Du, Q. Dai, S. Williams, C.-Z. Wang, and C.-S. Yuan, "Synthesis of propanaxadiol derivatives and evaluation of their anticancer activities," *Anti-Cancer Drugs*, vol. 22, no. 1, pp. 35–45, 2011.
- [5] H. J. Kang, S. H. Lee, J. E. Price, and L. S. Kim, "Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB in breast cancer cells and potentiates the growth inhibitory effect of paclitaxel in a breast cancer nude mice model," *The Breast Journal*, vol. 15, no. 3, pp. 223–229, 2009.
- [6] Y. Wang, L. Rouggy, M. You, and R. Lubet, "Animal models of lung cancer: characterization and use for chemoprevention research," *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 105, pp. 211–226, 2012.
- [7] X.-W. Yang, X.-L. Wang, L.-Q. Cao et al., "Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate enhances 5-fluorouracil-induced cell growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells," *Hepatology Research*, vol. 42, no. 5, pp. 494–501, 2012.
- [8] A. J. Alonso-Castro, M. L. Villarreal, L. A. Salazar-Olivo, M. Gomez-Sanchez, F. Dominguez, and A. Garcia-Carranca, "Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 133, no. 3, pp. 945–972, 2011.
- [9] K.-K. Bai, F.-L. Chen, Z. Yu, Y.-Q. Zheng, Y.-N. Li, and Y.-H. Guo, "Synthesis of [3 β -acetoxy-urs-12-en-28-oyl]-1-mono-glyceride and investigation on its anti tumor effects against BGC-823," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 13, pp. 4043–4050, 2011.
- [10] I. Berdowska, B. Zieliński, I. Fecka, J. Kulbacka, J. Saczko, and A. Gamian, "Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells," *Food Chemistry*, vol. 141, no. 2, pp. 1313–1321, 2013.
- [11] C. M. Kaefler and J. A. Milner, "The role of herbs and spices in cancer prevention," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 19, no. 6, pp. 347–361, 2008.
- [12] A. Link, F. Balaguer, and A. Goel, "Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics," *Biochemical Pharmacology*, vol. 80, no. 12, pp. 1771–1792, 2010.
- [13] H. Wang, T. O. Khor, L. Shu et al., "Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 12, no. 10, pp. 1281–1305, 2012.
- [14] W. J. Lee and B. T. Zhu, "Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols," *Carcinogenesis*, vol. 27, no. 2, pp. 269–277, 2006.
- [15] G. L. Gierach, N. D. Freedman, A. Andaya et al., "Coffee intake and breast cancer risk in the NIH-AARP diet and health study cohort," *International Journal of Cancer*, vol. 131, no. 2, pp. 452–460, 2012.
- [16] E. Viveros-Valdez, C. Rivas-Morales, A. Oranday-Cárdenas, J. Castro-Garza, and P. Carranza-Rosales, "Antiproliferative effect from the Mexican poleo (*Hedeoma drummondii*)," *Journal of Medicinal Food*, vol. 13, no. 3, pp. 740–742, 2010.

- [17] D. Es-Saady, A. Simon, C. Jayat-Vignoles, A. J. Chulia, and C. Delage, "MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts," *Anticancer Research*, vol. 16, no. 1, pp. 481–486, 1996.
- [18] C. Martin-Cordero, M. Reyes, M. J. Ayuso, and M. V. Toro, "Cytotoxic triterpenoids from *Erica andevalensis*," *Zeitschrift für Naturforschung Section C: Journal of Biosciences*, vol. 56, no. 1-2, pp. 45–48, 2001.
- [19] I. Lee, J. Lee, Y. H. Lee, and J. Leonard, "Ursolic acid-induced changes in tumor growth, O₂ consumption, and tumor interstitial fluid pressure," *Anticancer Research*, vol. 21, no. 4, pp. 2827–2833, 2001.
- [20] E. Kassi, T. G. Sourlingas, M. Spiliotaki et al., "Ursolic acid triggers apoptosis and Bcl-2 downregulation in MCF-7 breast cancer cells," *Cancer Investigation*, vol. 27, no. 7, pp. 723–733, 2009.
- [21] C.-T. Yeh, C.-H. Wu, and G.-C. Yen, "Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells by modulating c-Jun N-terminal kinase, Akt and mammalian target of rapamycin signaling," *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 54, no. 9, pp. 1285–1295, 2010.
- [22] J.-Z. Shan, Y.-Y. Xuan, S.-Q. Ruan, and M. Sun, "Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells *in vitro*," *Chinese Journal of Integrative Medicine*, vol. 17, no. 8, pp. 607–611, 2011.
- [23] M. A. Furtado, L. C. F. de Almeida, R. A. Furtado, W. R. Cunha, and D. C. Tavares, "Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay," *Mutation Research—Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 657, no. 2, pp. 150–154, 2008.
- [24] M. Shekarchi, H. Hajimehdipoor, S. Saeidnia, A. R. Gohari, and M. P. Hamedani, "Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family," *Pharmacognosy Magazine*, vol. 8, no. 29, pp. 37–41, 2012.
- [25] K. Venkatachalam, S. Gunasekaran, V. A. S. Jesudoss, and N. Namasivayam, "The effect of rosmarinic acid on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 65, no. 4, pp. 409–418, 2013.
- [26] J. Paluszczak, V. Krajka-Kuźniak, and W. Baer-Dubowska, "The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells," *Toxicology Letters*, vol. 192, no. 2, pp. 119–125, 2010.
- [27] T. P. Stanojković, A. Konić-Ristić, Z. D. Juranić et al., "Cytotoxic and cell cycle effects induced by two herbal extracts on human cervix carcinoma and human breast cancer cell lines," *Journal of medicinal food*, vol. 13, no. 2, pp. 291–297, 2010.
- [28] Y. Xu, Z. Jiang, G. Ji, and J. Liu, "Inhibition of bone metastasis from breast carcinoma by rosmarinic acid," *Planta Medica*, vol. 76, no. 10, pp. 956–962, 2010.
- [29] S. J. Conde, R. D. A. M. Luvizotto, M. T. De Sábio, and C. R. Nogueira, "Human breast tumor slices as an alternative approach to cell lines to individualize research for each patient," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 21, no. 4, pp. 333–335, 2012.
- [30] I. A. M. de Graaf, P. Olinga, M. H. de Jager et al., "Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies," *Nature Protocols*, vol. 5, no. 9, pp. 1540–1551, 2010.
- [31] M. Possidente, S. Dragoni, G. Franco et al., "Rat intestinal precision-cut slices as an *in vitro* model to study xenobiotic interaction with transporters," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 79, no. 2, pp. 343–348, 2011.
- [32] P. Olinga and D. Schuppan, "Precision-cut liver slices: a tool to model the liver *ex vivo*," *Journal of Hepatology*, vol. 58, no. 6, pp. 1252–1253, 2013.
- [33] R. De Kanter, A. Tuin, E. van de Kerkhof et al., "A new technique for preparing precision-cut slices from small intestine and colon for drug biotransformation studies," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 51, no. 1, pp. 65–72, 2005.
- [34] H.-U. Kasper, V. Dries, U. Drebber, M. A. Kern, H. P. Dienes, and P. Schirmacher, "Precision cut tissue slices of the liver as morphological tool for investigation of apoptosis," *In Vivo*, vol. 19, no. 2, pp. 423–432, 2005.
- [35] P. Carranza-Rosales, M. G. Santiago-Mauricio, N. E. Guzmán-Delgado et al., "Precision-cut hamster liver slices as an *ex vivo* model to study amoebic liver abscess," *Experimental Parasitology*, vol. 126, no. 2, pp. 117–125, 2010.
- [36] P. Carranza-Rosales, M. G. Santiago-Mauricio, N. E. Guzmán-Delgado et al., "Induction of virulence factors, apoptosis, and cytokines in precision-cut hamster liver slices infected with *Entamoeba histolytica*," *Experimental Parasitology*, vol. 132, no. 4, pp. 424–433, 2012.
- [37] T. O. Kirby, A. Rivera, D. Rein et al., "A novel *ex vivo* model system for evaluation of conditionally replicative adenoviruses therapeutic efficacy and toxicity," *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 24, pp. 8697–8703, 2004.
- [38] M. A. Stoff-Khalili, A. A. Rivera, L. P. Le et al., "Employment of liver tissue slice analysis to assay hepatotoxicity linked to replicative and nonreplicative adenoviral agents," *Cancer Gene Therapy*, vol. 13, no. 6, pp. 606–618, 2006.
- [39] M. G. Rots, M. G. L. Elferink, W. M. Gommans et al., "An *ex vivo* human model system to evaluate specificity of replicating and non-replicating gene therapy agents," *The Journal of Gene Medicine*, vol. 8, no. 1, pp. 35–41, 2006.
- [40] M. Zimmermann, S. Armeanu, I. Smirnow et al., "Human precision-cut liver tumor slices as a tumor patient-individual predictives test system for oncolytic measles vaccine viruses," *International Journal of Oncology*, vol. 34, no. 5, pp. 1247–1256, 2009.
- [41] M. A. van Geer, K. F. D. Kuhlmann, C. T. Bakker, F. J. W. ten Kate, R. P. J. O. Elferink, and P. J. Bosma, "Ex-vivo evaluation of gene therapy vectors in human pancreatic (cancer) tissue slices," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 15, no. 11, pp. 1359–1366, 2009.
- [42] M. A. Kern, A. M. Haugg, E. Eiteneuer et al., "Ex vivo analysis of antineoplastic agents in precision-cut tissue slices of human origin: effects of cyclooxygenase-2 inhibition in hepatocellular carcinoma," *Liver International*, vol. 26, no. 5, pp. 604–612, 2006.
- [43] P. Mestres, A. Morguet, W. Schmidt, A. Kob, and E. Thedinga, "A new method to assess drug sensitivity on breast tumor acute slices preparation," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1091, pp. 460–469, 2006.
- [44] H. van der Kuip, T. E. Mürdter, M. Sonnenberg et al., "Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment," *BMC Cancer*, vol. 6, article 86, 2006.
- [45] N. Parajuli and W. Doppler, "Precision-cut slice cultures of tumors from MMTV-neu mice for the study of the *ex vivo* response to cytokines and cytotoxic drugs," *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Animal*, vol. 45, no. 8, pp. 442–450, 2009.

- [46] R. Pazdur, A. P. Kudelka, J. J. Kavanagh, P. R. Cohen, and M. N. Raber, "The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere)," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 19, no. 4, pp. 351–386, 1993.
- [47] D. Lister-Sharp, M. S. McDonagh, K. S. Khan, and J. Kleijnen, "A rapid and systematic review of the effectiveness and cost-effectiveness of the taxanes used in the treatment of advanced breast and ovarian cancer," *Health Technology Assessment*, vol. 4, no. 17, pp. 1–113, 2000.
- [48] K. D. Miller and G. W. Sledge Jr., "Taxanes in the treatment of breast cancer: a prodigy comes of age," *Cancer Investigation*, vol. 17, no. 2, pp. 121–136, 1999.
- [49] C. C. Neto, A. J. Vaisberg, B.-N. Zhou, D. G. I. Kingston, and G. B. Hammond, "Cytotoxic triterpene acids from the peruvian medicinal plant *Polylepis racemosa*," *Planta Medica*, vol. 66, no. 5, pp. 483–484, 2000.
- [50] E. Evdokimova, H. Taper, and P. B. Calderon, "Effects of bacterial endotoxin (lipopolysaccharides) on survival and metabolism of cultured precision-cut rat liver slices," *Toxicology in Vitro*, vol. 16, no. 1, pp. 47–54, 2002.
- [51] S. Gurunathan, J. W. Han, V. Eppakayala, M. Jeyaraj, and J.-H. Kim, "Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 535796, 10 pages, 2013.
- [52] S. M. Veronese, M. Gambacorta, O. Gottardi, F. Scanzi, M. Ferrari, and P. Lampertico, "Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer," *Cancer*, vol. 71, no. 12, pp. 3926–3931, 1993.
- [53] J. A. Hickman, R. Graeser, R. de Hoogt et al., "Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity *in vitro/ex vivo*," *Biotechnology Journal*, vol. 9, no. 9, pp. 1115–1128, 2014.
- [54] J.-S. Diallo, D. Roy, H. Abdelbary, N. de Silva, and J. C. Bell, "Ex vivo infection of live tissue with oncolytic viruses," *Journal of Visualized Experiments*, no. 52, Article ID e2854, 2011.
- [55] D. L. Holliday, M. A. Moss, S. Pollock et al., "The practicalities of using tissue slices as preclinical organotypic breast cancer models," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 66, no. 3, pp. 253–255, 2013.
- [56] F. Pirnia, S. Frese, B. Gloor et al., "Ex vivo assessment of chemotherapy-induced apoptosis and associated molecular changes in patient tumor samples," *Anticancer Research*, vol. 26, no. 3, pp. 1765–1772, 2006.
- [57] L. Horev-Azaria, G. Baldi, D. Beno et al., "Predictive Toxicology of cobalt ferrite nanoparticles: comparative *in-vitro* study of different cellular models using methods of knowledge discovery from data," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 10, no. 1, article 32, 2013.
- [58] C. N. Ramirez, C. Antczak, and H. Djaballah, "Cell viability assessment: toward content-rich platforms," *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 5, no. 3, pp. 223–233, 2010.
- [59] S. N. Rampersad, "Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays," *Sensors*, vol. 12, no. 9, pp. 12347–12360, 2012.
- [60] R. Yerushalmi, R. Woods, P. M. Ravdin, M. M. Hayes, and K. A. Gelmon, "Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential," *The Lancet Oncology*, vol. 11, no. 2, pp. 174–183, 2010.
- [61] C. Milani, J. Welsh, M. L. H. Katayama et al., "Human breast tumor slices: a model for identification of vitamin D regulated genes in the tumor microenvironment," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 121, no. 1–2, pp. 151–155, 2010.
- [62] M. Sonnenberg, H. van der Kuip, S. Haubeiß et al., "Highly variable response to cytotoxic chemotherapy in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) from lung and breast," *BMC Cancer*, vol. 8, article 364, 2008.
- [63] M. Kampa, V.-I. Alexaki, G. Notas et al., "Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action," *Breast Cancer Research*, vol. 6, no. 2, pp. R63–R74, 2004.
- [64] A. Bishayee, S. Ahmed, N. Brankov, and M. Perloff, "Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer," *Frontiers in Bioscience*, vol. 16, no. 3, pp. 980–996, 2011.
- [65] P. J. Morin, "Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture," *Drug Resistance Updates*, vol. 6, no. 4, pp. 169–172, 2003.
- [66] H.-T. Chang, I.-L. Chen, C.-T. Chou et al., "Effect of caffeic acid on Ca²⁺ homeostasis and apoptosis in SCMI human gastric cancer cells," *Archives of Toxicology*, vol. 87, no. 12, pp. 2141–2150, 2013.
- [67] T. Luo, J. Wang, Y. Yin et al., "(–)-Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma," *Breast Cancer Research*, vol. 12, no. 1, article R8, 2010.
- [68] Y. Li, D. Xing, Q. Chen, and W. R. Chen, "Enhancement of chemotherapeutic agent-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB using ursolic acid," *International Journal of Cancer*, vol. 127, no. 2, pp. 462–473, 2010.
- [69] G.-Q. Chen, Z.-W. Yao, W.-P. Zheng, L. Chen, H. Duan, and Y. Shen, "Combined antitumor effect of ursolic acid and 5-fluorouracil on human esophageal carcinoma cell Eca-109 *in vitro*," *Chinese Journal of Cancer Research*, vol. 22, no. 1, pp. 62–67, 2010.
- [70] M. González-Vallinas, S. Molina, G. Vicente et al., "Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells," *Pharmacological Research*, vol. 72, pp. 61–68, 2013.
- [71] C.-L. Lin, R.-F. Chen, J. Y.-F. Chen et al., "Protective effect of caffeic acid on paclitaxel induced anti-proliferation and apoptosis of lung cancer cells involves NF-kb pathway," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 5, pp. 6236–6245, 2012.
- [72] L. H. Lash and R. K. Zalups, "Mercuric chloride-induced cytotoxicity and compensatory hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 261, no. 2, pp. 819–829, 1992.
- [73] D. M. Kendig and J. B. Tarloff, "Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: implications for *in vitro* toxicology studies," *Toxicology in Vitro*, vol. 21, no. 1, pp. 125–132, 2007.
- [74] M. C. Hohnholt, E. M. Blumrich, and R. Dringen, "Multiassay analysis of the toxic potential of hydrogen peroxide on cultured neurons," *Journal of Neuroscience Research*, 2014.
- [75] K. Tulpule, M. C. Hohnholt, J. Hirrlinger, and R. Dringen, "Primary cultures of astrocytes and neurons as model systems to study the metabolism and metabolite export from brain cells," in *Brain Energy Metabolism*, J. Hirrlinger and W. S. Waagepetersen, Eds., vol. 90, pp. 45–72, Springer, New York, NY, USA, 2014.
- [76] M. da Silva Morrone, A. M. de Assis, R. F. da Rocha et al., "*Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex*

- vivo models," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 60, pp. 45–51, 2013.
- [77] Y. Liu, L. Cao, J. Du et al., "Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in precision-cut liver slices in vitro and in vivo in common carp (*Cyprinus carpio* L.)," *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, vol. 169, pp. 65–72, 2015.
- [78] M. Gerlinger, A. J. Rowan, S. Horswell et al., "Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing," *The New England Journal of Medicine*, vol. 366, no. 10, pp. 883–892, 2012.
- [79] M. Eichelbaum, N. Spannbrucker, and H. J. Dengler, "Proceedings: N-oxidation of sparteine in man and its interindividual differences," *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol. 287, supplement R94, 1975.
- [80] W.-Q. Ge, J.-X. Pu, and S.-Y. Zheng, "Clinical application of the adenosine triphosphate-based response assay in intravesical chemotherapy for superficial bladder cancer," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 13, no. 2, pp. 689–692, 2012.
- [81] C. Marquette and L. Nabell, "Chemotherapy-resistant metastatic breast cancer," *Current Treatment Options in Oncology*, vol. 13, no. 2, pp. 263–275, 2012.